

#6



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT**

Aktenzeichen:	100 33 080.0
Anmeldetag:	07. Juli 2000
Anmelder/Inhaber:	BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH, Ingelheim/DE
Bezeichnung:	Tumorassoziertes Antigen (B345)
IPC:	C 07 K, C 12 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 07. Juni 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Weiner

Case 12/214 DI Fa/dc

BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH

55216 Ingelheim am Rhein (BRD)

Tumorassoziertes Antigen (B345)

Die Erfindung bezieht sich auf die Chemotherapie von Tumorerkrankungen.

Normale Körperzellen unterliegen einem strikt
5 geordneten System, das das Wachstum, die Zellteilung
und das Absterben bestimmter Zellen kontrolliert. So
teilen sich Körperzellen einer erwachsenen Person nur
dann, wenn sie tote Zellen ersetzen oder eine
Verletzung verheilen müssen. Krebszellen dagegen
10 wachsen unkontrolliert weiter, sie akkumulieren und
bilden einen Tumor. Erreicht der Tumor eine kritische
Größe, können Krebszellen über die Blutbahnen oder das
Lymphsystem auch in andere Bereiche des Körpers
transportiert werden und dort Kolonien bilden
15 (Metastasen). Nicht alle Tumore sind kanzerogen, denn
benigne Tumore metastasieren nicht und sind daher
meistens nicht lebensgefährlich, da sie chirurgisch
entfernt werden können. Detailliertere Informationen zu
diesem Thema sowie den weiter unten diskutierten
20 Aspekten der Tumorentstehung geben folgende
Publikationen: Rauscher und Vogt, 1997; Kastan, 1997;
Hesketh, 1995; Pusztai, Lewis und Yap, 1995; Wagener,
1996.

Die Transformation einer gesunden Zelle in eine
25 Krebszelle kann durch eine ganze Reihe von Faktoren wie
durch Umwelteinflüsse, Strahlung, Viren oder chemische
Reagenzien ausgelöst werden. Bei der Tumorentwicklung
spielen jedoch auch epigenetische (Methylierungen,
Acetylierungen und veränderte Chromatinstruktur) und

genetische Modifikationen (Punktmutation, Deletion, Amplifikation, Translokation) eine bedeutende Rolle.

Mutationen in kodierenden Bereichen von Genen, die an der Regulation der Zell-Proliferation beteiligt sind, können an der Überführung einer normalen Zelle in eine Tumorzelle beitragen, da die transformierte Zelle Wachstumsvorteile gegenüber ihrer gesunden Nachbarzelle hat.

Krebs entsteht also durch eine Ansammlung von vererbten oder erworbenen Mutationen in kritischen Protoonkogenen oder Tumorsuppressorgenen.

Die Zellproliferation steht unter der Kontrolle verschiedener Gensysteme, während Produkte von Onkogenen an der Signalvermittlung von Zelloberfläche zum Zellkern beteiligt sind, geleiten cyclinabhängige Proteinkinase und ihre Inhibitoren die Zelle durch den Zellzyklus. Nicht selten werden Störungen in der Synthese dieser Proteine bei Tumorzellen gefunden. Eine zentrale Rolle spielt dabei das p53-Protein.

Proteine vom Typ des RB-Proteins regulieren die Verfügbarkeit entscheidender Transkriptionsfaktoren.

Die in Tumorgewebe hochregulierten Gene stellen meist den Ausgangspunkt für weitere detaillierte Analysen dar und da Proteine verschiedenster Funktionen hochexprimiert werden, ist der Ansatz für therapeutische Interventionen sehr vielseitig. Es ist daher das Ziel der Krebsforschung weitere neue Zielmoleküle (sog. „Targets“) für therapeutische Interventionen zu finden, die dann für eine gezielte

Therapie mit geringen Nebenwirkungen benutzt werden können.

In erster Linie gilt es daher molekulare Veränderungen zwischen Normalgewebe und Tumor auf dem Niveau der Genexpression („Transkriptionslevel“) aufzudecken, die einerseits neue Targets identifizieren sollen und andererseits für die Entwicklung bzw. das Auffinden von Substanzen zur Hemmung von Fehlfunktionen herangezogen werden können.

- 10 Eine ganze Reihe verschiedenster Methoden zur Identifizierung und Charakterisierung von neuen Targets, die den Ausgangspunkt für die Entwicklung von neuen Therapeutika darstellen, basieren auf der Erstellung differenzieller mRNA Transkriptionsprofile
- 15 zwischen Tumoren und Normalgeweben. Dazu zählen die differenzielle Hybridisierung, die Erstellung von Subtraktions-cDNA-Banken („representational difference analysis“; Hubank und Schatz, 1994; Diatchenko et al., 1996) und der Einsatz der DNA-Chip Technologie oder der
- 20 SAGE-Methode (Velculescu et al., 1995).

- Neben immuntherapeutischen Ansätzen kommt der gezielten Chemotherapie eine wesentliche Rolle bei der Behandlung von Krebs zu. Unter Chemotherapie versteht man die Verabreichung von Substanzen, die durch Eingriff in
- 25 Stoffwechsel, Signaltransduktion und Zellteilungsvorgänge maligner Zellen entweder zytostatisch oder zytotoxisch-zytolytisch wirken. Chemotherapeutika lassen sich auf Grund der Beeinflussung von spezifischen Targets in der
- 30 Tumorzelle, nach Art der zellulären Interaktion und der

Wechselwirkung mit einer bestimmten Zellzyklusphase, in verschiedene Kategorien unterteilen.

Die Art der Krebsbehandlung hängt vom Tumorstadium ab, entscheidend ist dabei, ob bereits Metastasen vorhanden sind und wie weit diese im Körper verbreitet sind. Die Applikation von Zellgiften zur Krebsbehandlung ist, neben operativen Maßnahmen und der Strahlentherapie, ein integraler Bestandteil der heutigen Therapiekonzepte in der Onkologie.

10 Im wesentlichen gibt es zwei Hauptziele der Chemotherapie: In erster Linie ist es die Heilung von Krebs; das bedeutet, dass der Tumor verschwindet und nicht mehr auftritt. Ist eine Heilung aus verschiedensten Gründen nicht mehr möglich, versucht man den Tumor in seinem Wachstum und seiner Ausbreitung einzuschränken bzw. zu kontrollieren.

Prinzipiell entfalten Substanzen, die bei der Chemotherapie Anwendung finden, ihre Wirkung bei allen sich teilenden Zellen. Tumorzellen zeigen jedoch eine höhere Empfindlichkeit gegenüber Chemotherapeutika als gesunde Zellen, da hauptsächlich stark proliferierende Zellen angegriffen werden.

Jedes Gewebe hat ein charakteristisches Wachstumsverhalten, das Zellteilung, Wachstumsstillstand, Differenzierung und Alterung umfasst und durch interne und externe Faktoren beeinflusst und reguliert wird.

Viele, der heute eingesetzten zytotoxischen Chemotherapeutika wirken nur bei proliferierenden Zellen (nicht in der G0-Phase der Zellteilung). Dabei

werden allerdings sowohl Normal- als auch Krebszellen attackiert. Die Zerstörung von normalen Zellen kann zu starken Nebeneffekten führen; z.B. Zerstörung der Blutzellen-produzierenden Gewebe des Knochenmarks
 5 (Myelosuppression).

Chemotherapeutika werden je nachdem, wie sie spezifische Substanzen innerhalb der Tumorzelle beeinflussen, mit welchen zellulären Prozessen die Medikamente interagieren und welche Zellzyklusphase sie
 10 beeinflussen, in verschiedene Kategorien unterteilt. Diese Informationen sind für Onkologen notwendig für die Entscheidung welche Präparate bei der Therapie miteinander kombiniert werden können.

Die in Tumorgeweben hochregulierten Gene stellen somit
 15 potentielle neue Zielstrukturen dar und da Proteine verschiedenster Funktionen hochexprimiert werden, ist der Ansatz für therapeutische Interventionen sehr vielseitig.

Es ist daher das Ziel der Krebsforschung, weitere neue
 20 Targets für therapeutische Interventionen zu finden, die dann für eine gezielte Therapie mit - verglichen mit derzeitig eingesetzten Therapeutika - geringeren Nebenwirkungen benutzt werden können.

In Tumorgeweben hochregulierte Gene stellen
 25 Angriffspunkte und somit potentielle Zielstrukturen („Targets“) für die Chemotherapie dar.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, ein neues, bevorzugt von Tumorzellen exprimiertes Protein bereitzustellen, das ein Zielmolekül für die

Intervention mittels chemotherapeutischer Methoden darstellt.

Diese Aufgabe wurde gelöst, indem zunächst mittels RDA („representational difference analysis“) zwischen einer
 5 Lungen-Adenokarzinom-Zelllinie (A549) und
 Normallungengewebe eine cDNA-Substraktionsbibliothek
 hergestellt wurde. Zur Selektion der im Tumor
 überexprimierten Antigene wurden anschließend die
 erhaltenen cDNA-Klone sequenziert und mit in
 10 Datenbanken verfügbaren Sequenzen verglichen. Unter den
 dabei annotierten Genen befanden sich 321 unbekannte,
 zu denen größtenteils ESTs („expressed sequence tags“)
 -Einträge in der Datenbank existierten. Nach einer
 weiteren qualitativen PCR-Analyse in cDNA-Bibliotheken
 15 von kritischen Normalgeweben und immunprivilegierten
 Geweben sowie detaillierteren Datenbankrecherchen wurde
 die Anzahl der Kandidatenklone auf 59 eingeschränkt,
 deren ESTs nicht aus kritischen Normalgeweben stammen.

Diese Klone wurden auf Incyte DNA Chips gespottet und
 20 mit einer ganzen Reihe von Tumorgeweben und
 Normalgeweben als Referenz hybridisiert. Das mRNA
 Expressionsprofil von EST Fragmenten, die in
 Krebsgeweben und Normalgeweben differentiell exprimiert
 werden und zu einem noch unbekannten Gen gehören, wurde
 25 mit unterschiedlichen Methoden verifiziert.

Die Länge der Transkripte wurde mittels Northern blot
 Analyse bestimmt und das Expressionsmuster in
 verschiedenen Zellsystemen durch quantitative PCR exakt
 charakterisiert. Nur unbekannte Gene bzw. ESTs mit
 30 tumorspezifischen Expressionsprofil wurden

weiterverfolgt und einer "full length Klonierung" unterworfen. Potentielle ORFs („open reading frames“) werden in die entsprechende Aminosäuresequenz umgewandelt und zur möglichen Funktionsvorhersage mittels in silico Strategien analysiert.

Die humane B345-cDNA wurde kloniert, die erhaltene Sequenz ist in SEQ-ID NO:1 dargestellt. Die Sequenzanalyse der klonierten humanen B345-cDNA ergab, dass von Position 215 bis Position 2461 (exklusive Stopcodon) ein durchgehender offener Leserahmen vorliegt, der, auf Nukleotid- und Proteinebene, in den bekannten Sequenzen der Datenbanken keine Homologie oder Identität aufweist. Aus den aus Northern Blot Experimenten gewonnenen Daten ist zu schließen, dass das B345-Transkript eine Länge von ca. 6,5 kb hat. Der klonierte Bereich der B345-cDNA beträgt 5897 bp (exklusive polyA-Region), wobei das Vorhandensein eines Polyadenylationssignals und des PolyA-Tails am 3'-Ende der Sequenz für die Vollständigkeit der cDNA in diesem Bereich spricht. Aufgrund der Tatsache, dass im 5'-Bereich der klonierten cDNA von Position 1 bis 214 kein durchgehender Leserahmen vorhanden ist, kann gefolgert werden, dass es sich bei dem ATG an Position 215, die auch zu 75% einer Kozak Translationinitiationsstelle (ACCATGT) (Kozak, 1987) entspricht, um das Startkodon von B345 handelt.

Zusätzliche Information über die weiter stromaufwärts liegende Sequenz von B345 kann durch molekularbiologische Standardmethoden gewonnen werden, z.B. mittels 5'-RACE („rapid amplification of cDNA ends“). Bei dieser Methode wird RNA, vorzugsweise mRNA,

aus Zellen oder Geweben, in denen B345 transkribiert wird (z.B. Kolonkarzinom-Gewebe oder Zelllinie von einem Kolonadenokarzinom abgeleitet wie z.B. Colo205) revers transkribiert und anschließend mit einem Adaptor bekannter Sequenz ligiert. Eine PCR mit einem Adaptorprimer (bindet spezifisch an den Adaptor am 5'-Ende der cDNA) und einem B345-spezifischen Primer erlaubt die Amplifikation entsprechender B345-Fragmente. Diese PCR-Produkte können nach Standardmethoden kloniert und, insbesondere durch DNA Sequenzierung, charakterisiert werden.

Eine alternative Methode zur Charakterisierung des 5'-Endes ist das Screenen von cDNA-Bibliotheken durch Hybridisierung mit für B345 spezifischen DNA-Sonden. Führt das Screenen von cDNA-Bibliotheken aufgrund methodisch bedingter Beschränkungen, z.B. ineffiziente reverse Transkription bedingt durch ausgeprägte Sekundärstrukturen der RNA, nicht zum gewünschten Ziel, können genomische Bibliotheken untersucht werden, indem z.B., wie beim Screenen von cDNA-Bibliotheken, durch Hybridisierung mit für B345 spezifischen DNA-Sonden, Klone isoliert werden können, die die stromaufwärts vom erhaltenen 5'-Ende der cDNA liegende Sequenzinformation z.B. die Promotorregion von B345 enthalten.

Die isolierte cDNA kodiert für das tumorspezifisches Protein der Bezeichnung B345 mit der in SEQ-ID NO: 2 angegebenen Aminosäuresequenz (B345). Die Sequenz von B345 wird definiert durch das Startcodon an Position 215 der isolierten B345-cDNA.

Die Erfindung betrifft somit in einem ersten Aspekt ein tumorspezifisches Protein mit der Bezeichnung B345, mit der in SEQ ID NO: 2 angegebenen Aminosäuresequenz.

Die erfindungsgemäßen DNA-Moleküle bzw. Fragmente
5 davon, kodieren für (Poly)peptide der Bezeichnung B345 mit der in SEQ-ID NO: 2 dargestellten Aminosäuresequenz bzw. für davon abgeleitete Proteinfragmente oder Peptide; damit sind DNA Moleküle mitumfasst, die durch die Degeneration des genetischen Codes Abweichungen von
10 der in SEQ-ID NO: 2 dargestellten Sequenz aufweisen.

In einer Ausführungsform der Erfindung werden DNA-Moleküle, kodierend für das natürliche B345-Polypeptid bzw. für Fragmente davon verwendet. Alternativ zur natürlichen B345-cDNA bzw. Fragmenten
15 davon können modifizierte Derivate verwendet werden. Diese umfassen Sequenzen mit Modifikationen, die für ein Protein(fragment) bzw. Peptide mit stärkerer Immunogenität kodieren, wobei für die Modifikationen auf DNA-Ebene dieselben Überlegungen gelten wie für die
20 oben beschriebenen Peptide. Eine weitere Art der Modifikation ist die Aneinanderreihung zahlreicher Sequenzen, kodierend für immunologisch relevante Peptide, nach Art einer Perlenschnur ("string-of-beads"; Toes et al., 1997). Die Sequenzen können auch
25 durch Anfügung von Hilfselementen modifiziert werden, z.B. Funktionen, die eine effizientere Abgabe und Prozessierung des Immunogens gewährleisten (Wu et al., 1995). Beispielsweise kann durch Anfügen einer Lokalisierungssequenz in das endoplasmatische Retikulum
30 ("ER targeting sequence") die Prozessierung und damit

die Präsentation und letztlich die Immunogenität des Antigens erhöht werden.

Die vorliegende Erfindung betrifft in einem weiteren Aspekt ein rekombinantes DNA-Molekül, das B345-DNA
5 enthält.

Die Erfindung betrifft in einem weiteren Aspekt Antikörper gegen B345 bzw. Fragmente davon. Polyklonale Antikörper können in herkömmlicher Weise durch Immunisierung von Tieren, insbesondere Kaninchen,
10 mittels Injektion des Antigens bzw. Fragmenten davon, und anschließender Reinigung des Immunglobulins erhalten werden.

Monoklonale anti-B345-Antikörper können nach Standardprotokollen gemäß dem von Köhler und Milstein,
15 1975, beschriebenen Prinzip gewonnen werden, indem Tiere, insbesondere Mäuse, immunisiert, anschließend antikörperproduzierende Zellen der immunisierten Tiere immortalisiert werden, z.B. durch Fusion mit Myelomzellen, und der Überstand der erhaltenen
20 Hybridome mittels immunologischer Standard-Assays auf monoklonale anti-B345-Antikörper gescreent wird. Für den therapeutischen oder diagnostischen Einsatz im Menschen können diese tierischen Antikörper gegebenenfalls auf herkömmliche Weise chimerisiert
25 (Neuberger et al., 1984, Boulianne et al., 1984) oder humanisiert (Riechmann et al., 1988, Graziano et al., 1995) werden.

Humane monoklonale anti-B345-Antikörper(fragmente) können auch von sog. „Phage Display Libraries“ (Winter
30 et al., 1994, Griffiths et al., 1994, Kruif et al.,

1995, Mc Guinness et al., 1996) und mittels transgener Tiere (Brüggemann et al., 1996, Jakobovits et al., 1995) gewonnen werden.

Die erfindungsgemäßen anti-B345-Antikörper können in
5 immunhistochemischen Analysen für diagnostische Zwecke eingesetzt werden.

In einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung die Verwendung von B345-spezifischen Antikörpern, um beliebige Substanzen selektiv zu bzw. in einen Tumor zu
10 bringen, der B345 exprimiert. Beispiele für solche Substanzen sind zytotoxische Agenzien oder radioaktive Nuklide, deren Wirkung darin besteht, den Tumor Vorort zu schädigen. Aufgrund der relativ tumorspezifischen Expression von B345 sind dabei nur geringe
15 Nebenwirkungen zu erwarten. In einem weiteren Aspekt können mit Hilfe von B345-Antikörpern Substanzen zur Sichtbarmachung von Tumoren, die B345 exprimieren, herangezogen werden. Dies ist für die Diagnose und die Bewertung des Therapieverlaufs von Nutzen.
20 Therapeutische und diagnostische Anwendungen von Antikörpern, die für anti-B345-Antikörper in Frage kommen, sind in der WO 95/33771 beschrieben.

Das Protein der Bezeichnung B345 gemäß der vorliegenden Erfindung und die davon abgeleiteten Proteinfragmente,
25 Peptide bzw. Peptid-Äquivalente oder Peptidomimetika können in der Krebstherapie eingesetzt werden, z. B. um eine Immunantwort gegen Tumorzellen zu induzieren, die die entsprechenden Antigen-Determinanten exprimieren. Vorzugsweise werden sie für die Therapie von

B345-positiven Tumoren verwendet, insbesondere beim Lungen- und Kolonkarzinom.

Es ist bekannt, dass tumorassoziierte Antigene tumorspezifische Mutationen aufweisen können, die zu einer immunologischen Unterscheidung zwischen Tumor und Normalgewebe beitragen (Mandrizzato et al., 1997; Hogan et al., 1998; Gaudi et al., 1999; Wölfel et al., 1994). Um das Vorhandensein tumorspezifischer B345-Mutationen festzustellen, wird, zweckmäßig mit Hilfe von Sonden aus der erfindungsgemäßen isolierten cDNA, die B345-cDNA aus einem oder mehreren unterschiedlichen Tumoren kloniert und die erhaltenen Sequenzen mit Normalgewebs-B345-cDNA verglichen. Es werden Versuche durchgeführt, die zeigen sollen, ob Tumor-B345-Peptide aus einem gegenüber Normalgewebs-B345 mutierten Sequenzabschnitt im Vergleich zu Normalgewebs-B345-Peptiden aus dem entsprechenden Abschnitt eine verstärkte Immunogenität aufweisen. Um zu bestätigen, dass etwaige Mutationen tumorspezifisch sind, können Antikörper gegen diese Bereiche generiert und Tumorzellen auf Expression von möglichen Mutationen untersucht werden.

Die vorliegende Erfindung betrifft somit in einem weiteren Aspekt B345-Peptide, abgeleitet von Bereichen eines tumorexprimierten B345, die tumorspezifische Mutationen aufweisen.

Auf Grund der bevorzugten Expression von B345 in Tumorzellen kann angenommen werden, dass dieses Protein eine wichtige Funktion für den Tumor hat, z.B. für Entstehung, Infiltration und Wachstum und somit ein

Target für die chemotherapeutische Intervention darstellt.

Im Hinblick auf seinen Einsatz als Target in der gezielten Chemotherapie wird B345 näher
5 charakterisiert, um die geeignete Strategie für die Intervention mit dieser Funktion zu entwickeln.

Als ersten Schritt bei der sog. „down-stream“ Funktionsanalyse von B345 führt man zweckmäßig in einem ersten Schritt eine bioinformatische Analyse durch, die
10 den für die experimentelle Validierung von B345 als Target richtungweisend ist.

Für diese Analyse stellen die auf Ähnlichkeit und modularer Struktur beruhenden Bioinformatik-Konzepte eine wesentliche Grundlage dar. Etablierte
15 bioinformatische Hilfsmittel zur Feststellung von Ähnlichkeiten sind BLAST
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>, Altschul et al., 1997) oder FASTA (Pearson & Lipman, 1988), die spezialisierten Datenbanken wie Pfam
20 (<http://www.sanger.ac.uk/Pfam>, Bateman et al., 2000) und SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>, Schultz et al., 2000), welche Domänenstrukturen berücksichtigen. Zur Verfeinerung der Analyse können Applikationen wie Clustal (<http://www2.ebi.ac.uk/clustalw>, Higgins et
25 al., 1996) HMMer (<http://hmmer.wustl.edu>), PSI-BLAST (Altschul et al., 1997) und die PROSITE Datenbank (<http://www.expasy.ch/prosite>, Hofmann et al., 1999) herangezogen werden. Statistische Analysemethoden, die nicht auf Homologien beruhen, gestatten die Vorhersage
30 weiterer struktur- und funktionsrelevanter

Eigenschaften wie der Sekundärstruktur und des Auftretens von Transmembransegmenten und Helix-Turn-Helix-Motiven. Methoden zur Vorhersage der Sekundärstruktur von Proteinen sind verfügbar;

- 5 besonders erwähnenswert ist Jpred (<http://barton.ebi.ac.uk/servers/jpred.html>, Cuff et al., 1998). Die Sekundärstrukturvorhersage kann Funktionshypothesen untermauern, etwa wenn die Struktur des vermuteten Homologen bekannt ist.

- 10 Gemäß Bioinformatikanalyse weist B345 eine helikale Transmembrandomäne auf, wobei sowohl der N-terminale als auch der C-terminale Bereich hydrophil sind, was darauf schließen lässt, dass dieses Protein ein Transmembranprotein darstellt. Der N-terminale, 15 extrazelluläre Bereich besitzt einige CUB-Domänen, welche zu Disulfidbrückenbildung neigen und daher bei der Dimerisierung bzw. bei Protein-Protein Wechselwirkungen beteiligt sind (Bork et al., 1993). Das C-terminale, intrazelluläre Ende zeigt Homologien 20 zu einer Rezeptorkinase und zu einem C-Kinase Substrat.

In weiterer Folge wird B345 einer biochemischen und biologischen Analyse unterworfen.

- In einem nächsten Schritt wird die Funktion von B345 für das Tumorgeschehen aufgeklärt; z.B. durch 25 Proliferationsassays in vitro oder in Tiermodellen, die das zu untersuchende B345-Gen überexprimieren (konstitutiv oder induzierbar) und als Kontrolle entweder in deletierter (inaktiver) Form exprimieren oder über Antisense hinunterregulieren (siehe z.B. 30 Grosveld und Kollias, 1992).

B345 kann in Screening-Assays verwendet werden, um Substanzen zu identifizieren, die die Aktivität dieses Proteins modulieren, insbesondere inhibieren. In einer Ausführungsform kann ein derartiger Assay z. B. darin
5 bestehen, das B345 Protein, oder ein aktives Fragment davon, in Zellen, die auf die Aktivität von B345 mit Proliferation reagieren, einzubringen bzw. die entsprechende B345 cDNA in der Zelle zur Expression zu bringen, und die Proliferation der Zellen in Gegenwart
10 und in Abwesenheit einer Testsubstanz zu bestimmen.

Ein Beispiel für Testzellen sind Zellen mit niedriger Teilungsrage, z.B. primäre Zellen, die kein endogenes B345 aufweisen. Um die Eignung der Zellen für einen Screening-Assay festzustellen, werden diese mit
15 B345-cDNA transformiert, gezüchtet und mit Standard-Assays, z.B. Thymidin-Einbau, auf ihre Proliferationsfähigkeit getestet. Aufgrund einer nach B345-Expression signifikanten Erhöhung ihrer Proliferationseigenschaft können sie als Testzellen
20 eingesetzt werden, z.B. in High Throughput Screening Proliferationsassays. Beispiele für Proliferationsassays im High Throughput Format, z.B. auf Grundlage des MTS-Assays, sind in der WO 98/00713 beschrieben.

25 Substanzen mit proliferationshemmender Wirkung können zur Behandlung von Tumoren mit starker B345-Expression verwendet werden, insbesondere beim Lungen-und Kolonkarzinom.

Figurenübersicht:

- Fig. 1A: Expressionsprofil von B345, B452 und B540 in
individuellen Lungenkarzinomen und
Lungentumorzelllinien.
- Fig. 1B: Expressionsprofil von B345 in normalem
Dickdarmgewebe und Tumorzelllinien.
- Fig. 1C: Graphische Darstellung des Alignments von
B345, B452 und B540.
- Fig. 2A: Northern Blot Analyse der Tumorzelllinie A549
mit einem 490bp langem B345 PCR-Produkt
- Fig. 2B: Northern Blot Analyse verschiedener
Normalgewebe mit einem 490bp langem B345
PCR-Produkt
- Fig. 2C: Northern Blot Analyse verschiedener
Krebsgewebe mit einem 318bp langem B345
PCR-Produkt
- Fig. 3 mRNA Expressionsanalyse von B345 durch
real-time PCR von Tumor und Normal-Geweben.
- Fig. 4: mRNA Expressionsanalyse von B345 durch
real-time PCR von Laser-Mikroskop-präparierten
Dickdarmtumoren (LCM) sowie normalem
Dickdarmgewebe und Tumorzelllinien.
- Fig. 5: Graphische Darstellung der Genstruktur von
B345.

Fig. 6: Hydrophilizitäts-und Transmembran-Blot des B345-Proteins

Fig. 7: Potentielle Proteinstruktur von B345

5 Tabellenübersicht

Tab. 1: Zusammenfassung der Northern Blot Daten von B345 in verschiedenen Normalgeweben (1A) und Krebszelllinien (1B)

10 Tab. 2A: Zusammenfassung der Daten der quantitativen PCR von B345 in verschiedenen Normal- und Krebsgeweben

15 Tab. 2B: Zusammenfassung der Daten der quantitativen PCR von B345 in verschiedenen Normalgeweben und mikrodisektierten Kolonadenokarzinom Geweben

Zeichenerklärung

+++	extrem positiv
++	stark positiv
20 +	positiv
(+)	schwach positiv
-	negativ

Beispiel 1

RDA („Representational Difference Analysis“) von der humanen Adenokarzinom-Zelllinie der Lunge (A549) und normalem Lungengewebe.

- 5 Die von ATCC bezogene humane Lungenadenokarzinom-Zelllinie A549 (CCL 185) wurde in T150 Zellkulturflaschen hochgezüchtet. Als Nährmedium diente MEM mit 10% hitze-inaktiviertem, fötalem Kälberserum und 2 mM L-Glutamin. Alle 3 bis 4 Tage wurden die
- 10 Zellen durch Trypsinisieren 1:5 bis 1:10 zur Propagation gespalten. Nach Erreichen von etwa 80% Konfluenz wurden pro T150 Zellkulturflasche 4 ml einer Trypsinlösung (Angaben pro Liter: 8g NaCl, 0,2g KCl, 1,13g Na₂HPO₄-wasserfrei, 0,2g KH₂PO₄,
- 15 100ml 2,5% Trypsinlösung, 1g EDTA-Na-Salz; pH 7,2 - 7,4) zum Ernten der Zellen eingesetzt. Die 4 ml wurden in ein 15 ml Falconröhrchen transferiert, mit 8 ml PBS versetzt, bei 1200 rpm in einer Haereus Tischzentrifuge (Megafuge 2.0R) 5 min bei 4°C zentrifugiert, das
- 20 Zellpellet mit 1 ml Lysis-Puffer (10mM Tris-HCl pH8, 140mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,5% NP40) versetzt, kräftig geschüttelt und in einem 2 ml Eppendorfgefäß bei 12 000 rpm und 4°C 5 min in einer Sigma Tischzentrifuge (Sigma 202 MK) abzentrifugiert. Der Überstand wurde in
- 25 ein neues Eppendorfgefäß transferiert und nach Zusatz von 55 µl 20% SDS-Lösung zweimal mit dem doppelten Volumen an einer CHCl₃/Phenol (1:1 v/v) Mischung und einmal mit dem einfachen Volumen an CHCl₃ extrahiert. Die wässrige RNA-enthaltende Phase wurde mit
- 30 1/10 Volumen an 3M NaAc (pH5) und dem zweifachen Volumen an 96% EtOH versetzt und über Nacht bei -20°C

die RNA präzipitiert. Ausgehend von 1 mg Gesamt-RNA wurde für die Isolierung von poly-A(+)RNA mittels des PolyATtract Kit (Promega) entsprechend dem Hersteller-Protokoll vorgegangen. Die Lagerung der A549 poly-
5 A(+)RNA mit einer Konzentration von 1 mg/ml in DEPC-behandeltem H₂O erfolgte in Aliquots bei -80°C.

Zur Durchführung der repräsentativen Differenzanalyse (RDA; Hubank and Schatz, 1994; Diatchenko et al., 1996) wurde die poly-A(+)RNA der Lungenadenokarzinom-Zelllinie
10 A549 als „tester“, die von normalem Lungengewebe (1 mg/ml; Clontech, Palo Alto; #6524-1) als „driver“ eingesetzt. Die RDA wurde unter Verwendung des PCR-select™ kit (Clontech, Palo Alto) entsprechend dem Hersteller-Protokoll durchgeführt, mit der Ausnahme,
15 dass ein modifiziertes Primer/Adaptor-2-Oligonukleotidsystem zum Einsatz kam: Adaptor-2-alt-1 (SEQ ID NO: 29) und nested-PCR-primer-2-alt (SEQ ID NO: 30) und Adaptor-2-alt-2 (SEQ ID NO: 31). Die neu generierten Primer/Adaptor-Sequenzen
20 ermöglichen durch die Anwesenheit von drei neuen Restriktionsenzymchnittstellen (Kpn I, Sac I und Xho I) in der Sequenz des nested-PCR-primer-2-alt nach Klonierung der subtrahierten cDNA-Fragmente in den pPCRII-Vektor ein nachträgliches Herausschneiden der
25 jeweiligen cDNA-Fragmente. Das Designen einer Primer/Adaptorsequenz mit mehreren verfügbaren Restriktionsenzymchnittstellen war deshalb notwendig, weil besonders in den Primersequenzen - bedingt durch die PCR-Amplifikationsschritte- oft Punktmutationen zu
30 beobachten waren.

Nach der Synthese von doppelsträngiger cDNA mittels oligo-dT wurde die erhaltene cDNA von „tester“ und „driver“ mit *RsaI* verdaut (*RsaI* ist ein 4-Basen erkennendes Restriktionsenzym und liefert im statistischen Mittel 256 bp lange cDNA-Fragmente). Gleiche Teile von „tester-cDNA“ wurden entweder mit den Adaptoren 1 oder 2 ligiert und anschließend getrennt mit einem Überschuss an „driver-cDNA“ bei 65°C hybridisiert. Danach wurden die beiden Ansätze vereinigt und einer zweiten Hybridisierung mit frischer denaturierter „driver-cDNA“ unterworfen. Die angereicherten „tester“-spezifischen cDNAs wurden anschließend durch PCR, mit für die Adaptoren 1 bzw. 2 spezifischen Primern, exponentiell amplifiziert. Für eine weitere Anreicherung wurde ein Aliquot dieser Reaktion einer zweiten PCR mit spezifischen nach innen versetzten („nested“) Primern unterworfen. Die aus dieser Reaktion resultierenden, exponentiell amplifizierten cDNA-Fragmente wurden direkt in den pCRII-Vektor (Invitrogen; „TA-cloning vector“) ligiert und anschließend ein Drittel des Ligationsansatzes in kompetente *E. coli* (OneShot™, Invitrogen) transfiziert.

712 positive Transformanten (Blau-Weiß-Selektion) wurden erhalten und in 96-Napf Blöcken in LB-Amp Medium (1,3 ml pro Napf) für 48 h bei 37°C kultiviert. Pro Napf wurden 750 µl der *E. coli* Suspensionen für die Präparation der Plasmid-DNA eingesetzt (96-Napf-Minipräparationsmethode von QIAGEN nach Vorschrift des Herstellers). Die verbleibenden Bakterienkulturen wurden als Glycerinstammkulturen bei -80°C gelagert.

Es wurde eine aus 712 Einzelklonen bestehende cDNA-Subtraktionsbibliothek erhalten, die sowohl in Form von *E. coli* Glycerin-Stammkulturen als auch in Form gereinigter Plasmide vorlag.

5

Beispiel 2

DNA-Sequenzierung und Annotation von TAA-Kandidaten:

Die isolierte Plasmid-DNA sämtlicher 712 Klone (siehe Beispiel 1) wurde nach der Sanger-Methode auf einem
 10 ABI-377 Prism Gerät sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden mittels der BioScout-Software (LION, Heidelberg) annotiert und Datenbankvergleichen (Genbank) unterzogen. Von 712 Klonen konnten 678
 15 sequenziert und annotiert werden. Der Rest (34) wies als Insert entweder nur poly(A) Sequenzen auf oder entsprach einem religierten Vektor oder war nicht sequenzierbar. Von den 678 annotierbaren Sequenzen erwiesen sich 357 als Gene mit bekannter Funktion. Die
 20 restlichen 321 repräsentierten Klone, kodierend für Gene mit unbekannter Funktion; 59 davon wiesen nicht einmal Einträge in der humanen EST-Datenbank auf. Bekannte Gene wurden nicht weiter behandelt. Für jene unbekannten Gene, für die ein EST-Eintrag verfügbar war, wurde eine Abschätzung des Expressionsprofils
 25 vorgenommen: dabei wurden all jene ESTs mit > 95% Identität (BLAST), die zur entsprechend experimentell ermittelten Sequenz der Subtraktionsbibliotheken gehörten, überprüft. Bei der Annotation wurde eine Unterteilung in a) kritische Normalgewebe, b) fötale,
 30 „verzichtbare“ und immunprivilegierte Gewebe und

c) Tumore und Tumor-Zelllinien vorgenommen. Auf der Basis dieses „virtuellen mRNA-Profiles“ („virtueller Northern blot“) wurden 200 Klone, für die keine ESTs in der Gruppe a) gefunden wurden, für weitere
5 experimentelle Analysen ausgewählt (inklusive der 59 Klone, für die keine EST-Eintragung vorlag). Zur weiteren Einengung der Kandidatenklone wurden aus den von den 200 ausgewählten Klonen ermittelten Sequenzen Oligonukleotidprimerpaare entworfen und synthetisiert.
10 Es wurden zunächst 8 verschiedene, von humanem Gewebe abgeleitete cDNA-Bibliotheken (GibcoBRL „SUPERSCRIPTTM“), welche direktional in pCMV-SPORT kloniert sind, mittels qualitativer PCR auf das Vorhandensein der jeweiligen Kandidaten getestet. Die
15 dabei eingesetzten cDNA-Bibliotheken stammten aus Gewebe von Herz (#10419-018), Leber (#10422-012), Leukozyten (#10421-022), Niere (#10420-016), Lunge (#10424-018), Testis (#10426-013), Gehirn (#10418-010) und fötalem Gehirn (#10662-013). Die PCR-Bedingungen
20 waren wie folgt: 20 µl Gesamtvolumen pro PCR-Ansatz enthielten 1x TaqPol-Puffer (50mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH9, 0,1% Triton X-100), 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs (Promega), 0,025 U/µl Taq-DNA-Polymerase (Promega), jeweils 5 pM an spezifischen Oligonukleotidprimer für
25 B345 (B345-D, SEQ ID NO: 32) und (B345-U, SEQ ID NO: 33) sowie 100 ng der jeweils zu untersuchenden Plasmid-DNA. Zur Kontrolle wurden spezifische Primer für GAPDH (SEQ ID NO: 34 und 35) eingesetzt. Zur Überprüfung des selektiven Nachweises wurden die
30 jeweiligen B345 spezifischen Primerpaare Oligonukleotidprimer (SEQ ID NO: 32) und (SEQ ID NO: 33) parallel auch auf das isolierte Plasmid mit dem

B345 „original Fragment“ hin ausgetestet (ursprünglich isoliertes cDNA-Fragment von B345). Die Nachweisbarkeit von Fragmenten der zu erwartenden Länge mit starkem Signal in einem der kritischen Normalgewebe (Herz, Leber, Lunge, Niere und Leukozyten), nicht jedoch in den cDNA-Bibliotheken aus immunprivilegierten Geweben (Gehirn, fötales Gehirn und Testis) unter diesen PCR-Bedingungen (1 Zyklus: 3' 94°C; 35 Zyklen: 1' 94°C - 1' 55°C - 1' 72°C; 1 Zyklus: 7' 72°C) wurde als Ausscheidungskriterium definiert. Mittels dieser qualitativen PCR-Analyse konnte die Zahl der Kandidaten auf 56 eingengt werden; Klon B345 befand sich in dieser bereits vorselektionierten Kandidatengruppe.

15 Beispiel 3

Expressionsanalyse durch cDNA Chip Hybridisierung:

Für das Design eines cDNA Chips wurden von der dBEST Datenbank über Nukleotid-Sequenzsuche eine Reihe von Klonen ausgewählt, die zu verschiedensten Funktionskategorien, wie Apoptose bis zur Zellzyklus-Regulation, gehören. Insgesamt wurden 1299 IMAGE Klone (davon repräsentieren 1024 bereits bekannte Gene) bestellt und zur Kontrolle sequenziert. Mikrotiterplatten mit Bakterien, die ca. 800bp lange Sequenzen vom 3'-Ende des Gens im Vektor enthalten, wurden an Incyte Pharmaceuticals, Inc. (USA) geschickt und diese dort auf 60 Chips gespottet. Neben diesen Klonen wurden auch 120 durch RDA identifizierte EST Klone auf die Chips gespottet. Die so produzierten DNA Chips wurden anschließend mit Cy3 markierter cDNA aus

Normalgewebe, Tumorgewebe und Zelllinien zusammen mit Cy5 markierter cDNA aus einer Mischung von neun verschiedenen Normalgeweben hybridisiert und die beiden Signale zur Normalisierung der Expressionswerte verglichen. Die Berechnungen erfolgten teilweise in S-Plus oder in Microsoft Excel. Die Auswertung der Chip Experimente ergab ein sehr ähnliches Expressionsprofil für B345, B540 und B452 bei der Hybridisierung mit Lungenkrebs Proben von Zelllinien und Patientenmaterial (Siehe Fig. 1A). Solch ein tumorassoziiertes Expressionsprofil konnte für B345 auch bei Vergleich von Kolon Adenokarzinom mit Kolon Normalgewebe gezeigt werden (Siehe Fig. 1B).

Das Sequenzalignment von B345, B540 und B452 zeigte eindeutig ein Überlappen der einzelnen EST Fragmente. Daher konnte man annehmen, dass es sich bei den drei Klonen um ESTs von ein und dem selben Gen handelt. Der daraus resultierende DNA Abschnitt deckt eine Länge von 843 bp ab (Siehe Fig. 1C) und wurde in weiteren Versuchen zur Durchsuchung von öffentlichen Datenbanken verwendet. Die Suchergebnisse lieferten keine signifikante Homologie zu bekannten DNA bzw. Protein Sequenzen, was darauf hindeutet, dass es sich bei B345 um ein bis lang unbekanntes Gen handelt.

25

Beispiel 4

Expressionsanalyse von B345 mittels Northern Blots:

Bei B345 handelt es sich um ein Gen mit unbekannter Funktion, dass offensichtlich laut DNA CHIP Analysen in

Tumorgewebe (siehe Fig. 1A und 1B, Tab. 1a und Tab. 1B) hochreguliert ist.

Um einerseits das erhaltene Transkriptionsprofil zu bestätigen und andererseits die Länge der zu erwartenden mRNA für die full size Klonierung zu bestimmen, wurde für B345 eine Northern Blot Analyse unter Einsatz von humanen Zelllinien und des "Human Multiple Tissue Northern Blots" (Clontech und Invitrogen) durchgeführt. Als Sonden dienten die mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ (NEN, Boston) markierten 490 bp bzw. 318bp langen PCR Produkte von B345 (Primer (SEQ-ID NO: 3 und SEQ-ID NO: 4 bzw. SEQ-ID NO:5 und SEQ-ID NO:6)). Die Hybridisierung erfolgte bei 68° für 2 h; die Visualisierung durch Standard-Autoradiografie (Hyperfilm, Amersham). Fig. 2A, 2B und 2C sowie Tab. 1a und Tab. 1B zeigen das Ergebnis dieser Analyse: Fig. 2A von der Zelllinie A549, Fig. 2B von 12 Normalgeweben (Periphere Blut Lymphozyten (PBL), Lunge, Placenta, Dünndarm, Leber, Niere, Milz, Thymus, Kolon, Skelettmuskel, Herz und Hirn) und Fig. 2C von 8 Krebszelllinien (Promyelozytische Leukämie HL60, HeLa-S3, chronische myelogene Leukämie K-562, lymphoblastische Leukämie MOLT-4, Burkitt's Lymphom (Raji), Kolon Adenokarzinom SW480, Lungen Adenokarzinom A549 und Melanom G361). Das B345-Transkript zeigt eine Länge von 6,5 kb.

Beispiel 5

Analyse des Expressionsprofils von B345 auf RNA-Ebene mittels quantitativer RT-PCR (real time PCR oder TaqMan-Analyse).

Um eine exaktere Quantifizierung der mRNA Expression in
5 den verschiedenen normal und Tumorgeweben durchzuführen, wurde die "real time PCR" angewandt, die es erlaubt die RNA-Konzentration im Vergleich zu einen externen Standard zu berechnen.

Die Isolierung der RNA aus Gefriergewebe erfolgte mit
10 Trizol gemäß dem Herstellerprotokoll von Gibco. Zur Entfernung von etwaig kontaminierender DNA wurde die präparierte RNA wie folgt mit DNAase I verdaut: 3 µg Gesamt-RNA wurden mit 20 µl 5x AMV Puffer (Promega), 1 µl RNasin (Promega) und 2 µl DNase I (Boehringer
15 Mannheim) in einem Gesamtvolumen von 80 µl 15 Minuten bei 37°C inkubiert. 120 µl Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol (25:24:1) wurden zugegeben, auf einem Vortexer gemischt und kurz abzentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen, mit 120 µl Chloroform:
20 Isoamylalkohol (24:1) versetzt und wie vorher zentrifugiert. Die gereinigte RNA wurde Ethanol-gefällt und in Wasser gelöst.

Anschließend wurde die Gesamt-RNA mit reverser
Transkriptase (Superscript, Gibco, BRL) in cDNA
25 umgeschrieben: Zu 3 µg Gesamt-RNA wurden 1 µl Oligo dT primer (Promega) zugegeben und mit Wasser auf ein Endvolumen von 10 µl gebracht. Nach einer Inkubation von 5 Minuten bei 70°C wurde die Lösung 5 Minuten bei Zimmertemperatur abgekühlt. 5 µl RT reaction buffer
30 (5x, Gibco, BRL), 2,5 µl dNTPs (je 10 mM, Boehringer

Mannheim), 1 µl RNasin (10U/µl, Promega), 1,5 µl Superscript (10 U/µl, Gibco, BRL) und 5 µl Wasser wurden zugegeben und 1 Stunde bei 42°C inkubiert und die Reaktion durch Inkubation von 3 Minuten bei 95°C
5 beendet.

Zur Herstellung eines cDNA-pools eines bestimmten Gewebe oder Tumortyps wurden 3 bis 10 verschiedene Einzelpräparationen von unterschiedlichen Patienten in gleichen Anteilen gemischt.

10 Die quantitative Bestimmung der „Haushaltsgene“ β -Aktin, GAPDH und Tubulin in cDNA-pools wurde wie folgt durchgeführt:

A) β -Actin-TaqMan PCR (Perkin Elmer)

Details über das Prinzip der TaqMan Methode siehe
15 Herstellerinformation (Perkin Elmer). Ein TaqMan PCR Lauf beinhaltete Proben an β -Actin-Kontrollsequenz mit je 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 und 10^6 Kopien/µl (Perkin Elmer) zur Bestimmung der Standardkurve, eine Negativkontrolle ohne DNA und die zu quantifizierenden cDNA-pools. Alle
20 Proben wurden in Triplikaten analysiert. Für einen 25 µl Reaktionsansatz wurden 1 µl cDNA, 2,5 µl 10× Puffer A (Perkin Elmer), 4 µl $MgCl_2$ (25 mM, (Perkin Elmer)), 0,5 µl je Nukleotid (10 mM dATP, dCTP, dGTP; 20 mM dUTP), 0,125 µl TaqMan Sonde (20 µM; TaqMan Sonde
25 für β -Aktin (SEQ-ID NO: 18 fluoreszenzmarkiert am 5'-Ende mit 6-Carboxyfluorescein und mit 6-Carboxytetramethylrhodamine am 3'-Ende), 1 µl je β -Aktin spezifischer Primer (je 20 µM, Forward Primer SEQ-ID NO:19 und Reverse Primer SEQ-ID NO:20), 0,25 µl
30 AmpErase uracil N-Glycosylase „UNG“ (1 U/µl, Perkin

Elmer), und 0,125 µl AmpliTaq Gold (5 U/µl, Perkin Elmer) gemischt, in MicroAmp Optical Tubes (Perkin Elmer) überführt und mit MicroAmp Optical Caps verschlossen. Die PCR wurde folgendermaßen

- 5 durchgeführt: ein Zyklus mit 2 Minuten 50°C für die UNG Reaktion, ein Zyklus 10 Minuten 95°C zur Aktivierung der AmpliTaq, 40 Zyklen mit je 15 Sekunden 95° und 1 Minute 60°C. Anschließend wurden die Proben auf 25°C gehalten. Die Auswertung der Daten erfolgt mit dem
- 10 Programm "Sequence Detection System 1.5b1" (PE Applied Biosystems), wobei im Prinzip die Fluoreszenzsignale der zu quantifizierenden cDNA-Proben mit den Signalen der Kontrollplasmidverdünnungen bekannter Konzentration verglichen wurden.

15 B) GAPDH-TaqMan PCR

Für die Quantifizierung von GAPDH, das wie β-Aktin oder Tubulin zur Normalisierung der eingesetzten RNAs verwendet wurde, sind folgende Primer bzw. Sonden eingesetzt worden. Als TaqMan Sonde für GAPDH diente

- 20 (SEQ-ID NO: 21) eine am 5'-Ende mit Tetrachlorfluorescein und am 3'-Ende mit Carboxymethylrhodamin markierte Sonde (Forward GAPDH Primer: SEQ-ID NO: 22 und Reverse Primer: SEQ-ID NO: 23). Die Reaktionen wurden wie oben beschrieben
- 25 durchgeführt.

C) Tubulin-SybrGreen PCR (Perkin Elmer)

Prinzip der SybrGreen PCR siehe Herstellerinformation (Perkin Elmer). Ein SybrGreen PCR Lauf beinhaltete

- 30 Proben an Tubulin-Kontrollplasmid mit je 10², 10³, 10⁴, 10⁵ und 10⁶ Kopien/µl (Perkin Elmer) zur Bestimmung der

Standardkurve, eine Negativkontrolle ohne DNA und die zu quantifizierenden cDNA-pools. Alle Proben wurden in Triplikaten analysiert. Für einen 25 µl Reaktionsansatz wurden 1 µl cDNA, 2,5 µl 10× SybrGreen Puffer (Perkin Elmer), 3,5 µl MgCl₂ (25 mM, Perkin Elmer)), 0,5 µl je Primer (je 20 µM, Perkin Elmer, Tubulin Forward (SEQ-ID NO:24); Tubulin reverse (SEQ-ID NO:25), 0,25 µl AmpErase uracil N-Glycosylase „UNG“ (1 U/µl, Perkin Elmer), und 0,25 µl AmpliTaq Gold (5 U/µl, Perkin Elmer) gemischt, in MicroAmp Optical Tubes (Perkin Elmer) überführt und mit MicroAmp Optical Caps verschlossen. Die PCR wurde folgendermaßen durchgeführt: ein Zyklus mit 2 Minuten 50°C für die UNG Reaktion, ein Zyklus 10 Minuten 95°C zur Aktivierung der AmpliTaq, 40 Zyklen mit je 15 Sekunden 95° und 1 Minute 60°C. Anschließend wurden die Proben auf 25°C gehalten. Die Auswertung der Daten erfolgt mit dem Programm "Sequence Detection System 1.5b1" (PE Applied Biosystems), wobei im Prinzip die Fluoreszenzsignale der zu quantifizierenden cDNA-Proben mit den Signalen der Kontrollplasmidverdünnungen bekannter Konzentration verglichen wurden.

D) B345-TaqMan PCR

Die quantitative TaqMan-PCR-Analyse von B345 wurde, wie für die „Haushaltsgene“ beschrieben, durchgeführt. Es wurden jedoch B345 spezifische Primer (SEQ-ID NO:26 und SEQ-ID NO:27) (200 ng/µl) und eine B345 spezifische Sonde (SEQ-ID NO:28, 20 µM), die am 5'-Ende mit Tetrachlorfluorescein und am 3'-Ende mit Carboxymethylrhodamin markiert ist, verwendet. Als Standard wurde das PCR Produkt von B345 mit den Primern

SEQ-ID NO: 26 und SEQ-ID NO: 27 mit bekannter Kopienzahl eingesetzt.

In Fig. 3 ist gezeigt, dass B345 höher in Dickdarmkrebsgewebe als in Normalgewebe exprimiert ist (siehe Tab. 2a). Nun stellt aber sowohl das Normalgewebe als auch das Tumorgewebe ein sehr heterogenes Gemisch von verschiedenen Zelltypen dar. Weiteres variiert der Anteil von Tumorzellen im Tumorgewebe sehr stark von etwa 30 bis 80%. Um diese biologische Heterogenität auf ein Minimum zu beschränken, wurden die Epithelzellen des Dickdarms, die die Ursprungszellen des Adenokarzinoms darstellen, und die Krebszellen oder Krebsareale durch Laser-Mikrodissektion spezifisch präpariert. Gewebeschnitte von 10µm Stärke wurden mit dem Kyromikrotom von Leica, Jung CM1800 angefertigt und auf einen mit Polyethylen beschichteten Objektträger aufgebracht (Böhm et al., 1997). Die bei Raumtemperatur für etwa 30 Minuten getrockneten Schnitte wurden mit Mayers Hämatoxylin (SIGMA DIAGNOSTICS) inkubiert und anschließend zur Entfernung von unspezifisch gebundenen Farbstoff fünf Minuten unter fließendem Wasser gewaschen. Nach fünf minütigem Trocknen bei 37°C wurde die Laser-Mikrodissektion durchgeführt. Dafür wurde das Lasermikroskop von PALM (PALM GmbH, Bernried, Deutschland) eingesetzt und etwa 2000 bis 5000 Zellen präpariert. Die durch Reverse Transkription gewonnene cDNA, wurde wiederum durch Real Time PCR analysiert. Das Ergebnis zeigt, dass die B345 Expression in Dickdarmkarzinom Zelllinien sowie in Patientenmaterial um ein Vielfaches höher ist als vergleichsweise die des Dickdarmnormalgewebes. Zur Normalisierung wurde der

Expressionslevel von GAPDH bestimmt (siehe Fig. 4 und Tab. 2B).

Beispiel 6

50 / Klonierung der gesamten cDNA von B345

Es gibt eine Reihe von Datenbanken mit Sequenzen von Genfragmenten (ESTs, expressed sequence tags) die man für die „in silico“ Klonierung von Genen heranziehen kann und deren Durchforstung mit B345 ein überlappendes
10 EST-Kontig von etwa 1500 bp ergab. Der polyA-Bereich an einem der Enden gab Hinweis auf die Orientierung des DNA Abschnittes in Bezug auf 5' - 3' Orientierung, was beim Design von neuen Primern für die Amplifikation von B345-spezifischen cDNA-Fragmenten essentiell ist.

15 Zunächst wurde das durch die Datenbankanalyse beschriebene potentielle 3' Ende, durch experimentelle Ansätze verifiziert. RNA von der Lungen-Karzinom Zelllinie Calu 6 (AACC No. HTB56) wurde mit Hilfe des Primers (SEQ-ID NO:7) revers transkribiert und die
20 resultierende einzelsträngige cDNA wurde mittels PCR mit den Gen spezifischen Primer SEQ-ID NO:3 und den Adapterprimer SEQ-ID NO: 8 amplifiziert.

Für einen 25 µl PCR Ansatz wurden 1 µl des cDNA-pools mit 2,5 µl 10×Taq Puffer (Promega), 1,5 µl MgCl₂ (25 mM, Promega), 0,5 µl dNTPs (je 10 mM, Boehringer Mannheim),
25 1 µl Primermischung (je 20 µM), 0,15 µl Taq Polymerase (Promega) in Wasser gemischt. Die PCR wurde wie folgt durchgeführt: 1× 94°C 3 Minuten; 30× 94°C 30 Sekunden,

55°C 30 Sekunden, 72°C 1 Minute; auf 4°C halten. Die PCR wurde auf einem 1,2% Agarosegel analysiert.

Die beiden Primer wurden anschließend zum Sequenzieren des gereinigten PCR Produktes verwendet. Die

5 ermittelten Sequenzen zeigten eine hohe Homologie mit dem „in silico“ klonierten DNA Abschnitt (inklusive des Poly-Trakts).

Da das Klonieren von 5' Endsequenzen meist einen sehr aufwendigen Prozess darstellt, wurden im Folgenden zur
10 Lösung des Problems verschiedene Methoden angewandt.

Als Ausgangszelllinie wurde wiederum Calu 6 verwendet. Nach der reversen Transkription der RNA mit dem Primer SEQ-ID NO: 7 und der Zweitstrangsynthese wurde an die Doppelstrang-cDNA ein Linker bestehend aus den beiden
15 Oligos SEQ-ID NO: 9 und SEQ-ID NO: 10 ligiert (Abe et al., 1992). Die daraus resultierende LoneLinker cDNA Bibliothek wurde dann mit dem Gen spezifischen Primer SEQ-ID NO: 4 linear über 35 Zyklen amplifiziert. Ein Aliquot der B345 angereicherten cDNA konnte
20 anschließend mit den Primern SEQ-ID NO: 11 und LLEcoRIA SEQ-ID NO: 9 weiter amplifiziert werden. Nach der Gelelektrophorese eines Aliquots und Southernanalyse mit dem genspezifischen Oligo SEQ-ID NO: 12 konnte eine 5 kb Bande lokalisiert werden. In weiterer Folge wurde
25 dieses Fragment schrittweise sequenziert und mit dem EST-Kontig aligned.

Um die resultierende Sequenz aus der LLcDNA Klonierung zu überprüfen wurden zwei Fragmente mittels PCR (SEQ ID NO: 13 und SEQ ID NO: 14 bzw. SEQ ID NO: 4 und SEQ ID
30 NO: 15) amplifiziert und für das Screenen von Lambda

gt10 cDNA Phagen Bibliotheken eingesetzt. Positive Plaques wurden isoliert und mittels den gt10 spezifischen Primern (SEQ ID NO: 16 und SEQ ID NO: 17) PCR amplifiziert. Anschließend Sequenzierung und das Alignment mit den Sequenzen führte zu der Annahme das es sich hierbei um ein differenzielles Spleißprodukt handelt. Die Spleißdonor, Akzeptor und Lariatsequenz konnte in weiterer Folge gefunden werden. Mittels PCR durch geeigneter Primerkombination wurden in verschiedenen Zelllinien nach differenziellen Spleißprodukten gesucht, wobei in allen gescreenten Zelllinien nur ein Produkt gefunden werden konnte und zu der in Fig. 5 dargestellten Genstruktur führte. Die angeführte cDNA besitzt einen offenen Leserahmen (ORF) der für ein potentiell Protein mit einer Länge von 749 Aminosäuren kodiert. Die Translationsinitiationsstelle an Position 215 entspricht etwa zu 75% einer Kozak-Konsensussequenz. Jedoch muß die Transkriptionsinitiationsstelle noch exakt durch Primer Extension bzw. RNase Protektion bestimmt werden, um sicher zu gehen, dass das 5' Ende von B345 vorliegt. Die Aminosäuresequenz von B345 ist in SEQ-ID NO: 2 gezeigt.

25 Beispiel 7

Bioinformatik-Analyse: Mögliche Funktion von B345

Die resultierende primäre Aminosäuresequenz von B345 ist in SEQ ID NO: 2 gezeigt. Die Analyse des Hydrophilizitäts Plots der Aminosäuresequenz mit der Methode von Kyte und Doolittle (1982) mit einer

Fenstergröße von 7 zeigt, dass das B345 Protein eine charakteristische hydrophobe Domäne aufweist (AS 600-622) von der angenommen werden kann, dass sie eine helikale Transmembrandomäne darstellt (siehe Fig. 6).

- 5 Sowohl das C-terminale als auch das N-terminale Ende von B345 sind hydrophil. Diese polarisierte Struktur deutet darauf hin, dass es sich dabei aller Wahrscheinlichkeit nach um ein integrales Membranprotein handelt. Die Transmembranhelix
10 verbindet eine etwa 600 Aminosäuren langen extrazellulären und einen kurzen (125 Aminosäuren) intrazellulären Teil (siehe Fig. 7).

- Die extrazelluläre Domäne weist außerdem klare Indizien für die Existenz einer CUB Domäne bei Position 158-247
15 und weniger eindeutige Indizien für 2 weitere CUB Domänen im Bereich 360-600 auf. Der C-terminale intrazelluläre Bereich könnte möglicherweise ein Kinasesubstrat darstellen. Die CUB Domänen kommen bei diversen, meist bei der Entwicklung regulierten
20 Proteinen vor. Außerdem sind manchmal bei EGF-ähnlichen Domänen auch CUB Domänen anzutreffen. Das Protein weist außerdem 12 potentielle N- Glycosylierungsstellen auf, die in der vorhergesagten extrazellulären Domäne zu finden sind, was wiederum mit der vorhergesagten
25 Orientierung des Proteins übereinstimmt.

- Mit einem BLAST hit (E-value: 5.8×10^{-2}) für den Bereich von 169 bis 216 von B345 konnte eine Komplement aktivierende Komponente des *RA-reactive factor* (RARF) aus *mus musculus* identifiziert werden. Das Alignment
30 befindet sich innerhalb der CUB Domäne 1 von B345.

Die CUB-Domänen 2 and 3 (Bereich 359-471 und 481-594) weisen marginale Homologien zu dem humanen und Fugu Prokollagen C-Proteinase Enhancer Protein (PCOLCE) auf. Diese Regionen kommen in dem Bereich von PCOLCE vor, 5 welcher ein CUB Domänen Tandem Repeat enthält (E-values: 0.5 (human) und 2.7 (Fugu)). CUB Domänen kommen manchmal in Repeats vor.

Vermutlich bildet das B345-Protein eine β -Sheet Sekundärstruktur, da sich CUB Domänen bekanntlich als 10 β -Sandwich falten.

Die intrazelluläre Domäne (Bereich 623-749) weist keine signifikanten Homologien auf. Der gesamte C-Terminus aligned jedoch mit einem EST von humanen Eierstockkrebs Zellen (82% Identität über 124 Aminosäuren). Der 15 Bereich 602-656 zeigt Homologien zu einer möglichen *A. thaliana* Rezeptor Kinase, während die Region um Position 611-659 zu einer *A. thaliana* potentiellen Serine/Threonine Kinase Ähnlichkeiten aufweist.

Tab. 1A

Gewebe	Expression
PBL	-
Lunge	++
Plazenta	+
Dünndarm	+
Leber	-
Niere	++
Milz	-
Thymus	-
Kolon	+
Skelettmuskel	-
Herz	-
Hirn	-

Tab. 1B

Zelllinie	Expression
promyelocytische Leukämie HL60	-
HELA Zellen S3	-
Chronische Myelogene Leukämie K-562	+
Lymphoblastische Leukämie MOLT-4	-
Burkitt's Lymphom (Raji)	-
Kolon Adenokarzinom SW480	+++
Lungen Adenokarzinom A549	+
Melanom G361	-

Tab. 2A

Gewebe	Expression B345 / Actin	Expression B345 / Tubulin
Lunge Adenokarzinom	+	+
Lunge Adenokarzinom	+	+
Lunge Normal	- bis (+)	(+)
Kolon Adenokarzinom	++	++
Kolon Adenokarzinom	+++	+++
Kolon Normal	- bis (+)	+
Mamma IDC	+	+
Brust	-	-
Hodgkin`s Lymphom	-	-
Milz	-	-
Testis	-	-

Tab. 2B

Zelllinien und Gewebe	Expression B345 / GAPDH
Kolon Adenokarzinom SW480	+
Kolon Normal (Clonotech)	(+)
Kolon Normal (Invitrogen)	(+)
Lungen Adenokarzinom A549	(+)
Kolon Adenokarzinom Colo 205	+++
PG 102142 Tumor (Colon Ac.)	+++
PG 21900 Tumor (Colon Ac.)	++
PG 7066 Tumor (Colon Ac.)	+++
PG 32389 Tumor (Colon Ac.)	++

Literatur

- Abe, K., Rapid isolation of desired sequences from lone linker PCR amplified cDNA mixture: application to
 5 identification and recovery of expressed sequences in cloned genomic DNA. *Mamm. Genome* 2,252-259
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein
 10 database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402 (1997).
- Bateman, A., Birney, E., Durbin, R., Eddy, S. R., Howe, K. L. and Sonnhammer, E. L. The Pfam Protein Families Database. *Nucleic Acids Res.* 28, 263-266 (2000).
- 15 Bork, P. et al. (1993). The CUB domain. A widespread module in developmentally regulated proteins. *J.Mol. Biol.* 231: 539-545
- Boulianne, G. L., et al., (1984), *Nature* 312: 643-646
- Böhm et al., *A.J. of Pathology* 151,1:63-67, 1997
- 20 Brüggemann, M. und Neuberger, M.S., (1996), *Immunol. Today* 17: 391-397
- Cuff, J. A., Clamp, M. E., Siddiqui, A. S., Finlay, M. and Barton, G. J. Jpred: a consensus secondary structure prediction server. *Bioinformatics* 14, 892-893
 25 (1998).

- Diatchenko, L., Lau, Y.F., Campbell, A.P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E.D., and Siebert, P.D. (1996), Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93, 6025-6030.
- 5 Gaudi C, Kremer F, Angevin E, Scott V, Triebel F (1999), J Immunol 162:1730-1738
- Graziano, R.F., et al., (1995), J. Immunol. 155: 4996-5002
- Griffiths, A.D., et al., (1994), EMBO J. 13: 3245-3260
- 10 Grosveld, F. and Kollias, G. Transgenic Animals, Academic Press (1992)
- Hesketh, R., (1995), The oncogene, Academic Press
- Higgins, D. G., Thompson, J. D. and Gibson, T. J. Using CLUSTAL for Multiple Sequence Alignments. Methods
- 15 Enzymol. 266, 383-402 (1996).
- Hogan KT, Eisinger DP, Cupp SBC, Lekstrom KJ, Deacon DD, Shabanowitz J, Hunt DF, Engelhard VH, Slingluff CL, Ross MM (1998), Cancer Res 58:5144-5150
- Hofmann, K., Buchner, P., Falquet, L. and Bairoch, A.
- 20 The PROSITE database, its status in 1999. Nucleic Acids Res. 27, 215-219 (1999).
- Hubank, M. and Schatz, D.G., (1994), Nucleic. Acids. Res. 22, 5640-5648.
- Jakobovits, A., (1995), Curr. Opin. Biotechnol. 6:
- 25 561-566

Kasten, M.B., (1997), Genetic Instability and Tumorigenesis, Springer Verlag

Köhler, G. und Milstein, C. (1975), Nature 265, 495-497

Kozak, M (1987), An analysis of 5`noncoding sequences
5 from 99 vertebrates messenger RNA's . Nuc.Ac.Res.
Vol.15: 8125-8147

Kruif, J., et al., (1995), Proc. Natl. Acad. Sci.
USA 92: 3938-3942

Kyte, J and Doolittle, RF (1982), J. Mol. Biol. 157:
10 105-132

Mandruzzato S, Brasseur F, Andry G, Boon T, van der
Bruggen P (1997) , J Exp Med 186:785-793

McGuinness, B.T., et al., (1996), Nature Biotechnol. 14,
1149

15 Neuberger, M.S., et al., (1984), Nature 312: 604-608

Pearson, W. R. and Lipman, D. J. Improved tools for
biological sequence comparison. Proc. Natl. Acad. Sci.
USA 85, 2444-2448 (1988).

Pusztal et al., 1996, cell proliferation in cancer,
20 Oxford medical publications

Rauscher, F.J. et al., (1997), Chromosomal
translocations and oncogenic transcription factors,
Springer Verlag

Riechmann, L., et al., (1988), Nature 332: 323-327

- Schultz, J., Copley, R. R., Doerks, T., Ponting, C. P. and Bork, P. SMART: A Web-based tool for the study of genetically mobile domains. *Nucleic Acids Res.* 28, 231-234 (2000).
- 5 Toes, R.E., Hoebe, R.C., Van der Voort, E., Rensing, M.E., Van-der-Eb, A.J. Melief, C.J.M., and Offringa, R. (1997), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94 (26): 14660-14665
- 10 Velculescu, V.E., Zhang, L, Vogelstein, B, and Kinzler, K.W (1995), *Science* 270: 484-487
- Wagner, C., 1996, *Molekulare Onkologie*, Thieme
- Winter, G., et al., (1994), *Annu. Rev. Immunol.* 12, 433-455
- 15 Woelfel, T, Schneider, J, Zum Buschenfelde, Meyer, KH, Rammensee, HG, Rotzschke, O, and Falk, K (1994), *Int. J. Cancer* 57: 413-418
- 20 Wu, T.C., Guarnieri, F.G., Staveley-O'Carroll, K.F., Viscidi, R.P., Levitsky, H.I., Hedrick, L., Cho, K.R., August, J.T., and Pardoll, D.M. (1995), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92 (25): 11671-11675.

Patentansprüche

1. Tumorassoziiertes Antigen der Bezeichnung B345,
5 dadurch gekennzeichnet, daß es die in SEQ ID NO: 2
definierte Aminosäuresequenz aufweist oder diese
als Teilsequenz enthält.
2. Isoliertes DNA-Molekül, kodierend für das in
10 Anspruch 1 definierte tumorassoziierte Antigen
oder für Fragmente davon.
3. DNA-Molekül nach Anspruch 2, dadurch
gekennzeichnet, daß es ein Polynukleotid mit der
in SEQ ID NO: 1 dargestellten Sequenz ist oder
15 diese Sequenz enthält oder daß es ein
Polynukleotid ist oder dieses enthält, das mit
einem Polynukleotid der in SEQ ID NO: 1
dargestellten Sequenz unter stringenten
Bedingungen hybridisiert.
4. Rekombinantes DNA-Molekül, enthaltend ein DNA-
20 Molekül gemäß Anspruch 2 oder 3.
5. Antikörper gegen das in in Anspruch 1 definierte
Polypeptid.
6. Antikörper nach Anspruch 5, dadurch
gekennzeichnet, daß er monoklonal ist.
- 25 7. Antikörper nach Anspruch 5 oder 6 für die Therapie
und Diagnose von Krebserkrankungen, die mit der
Expression von B345 assoziiert sind.

5

Zusammenfassung

Tumorassoziertes Antigen B345 und dafür kodierende
DNA-Moleküle.

10

Expression

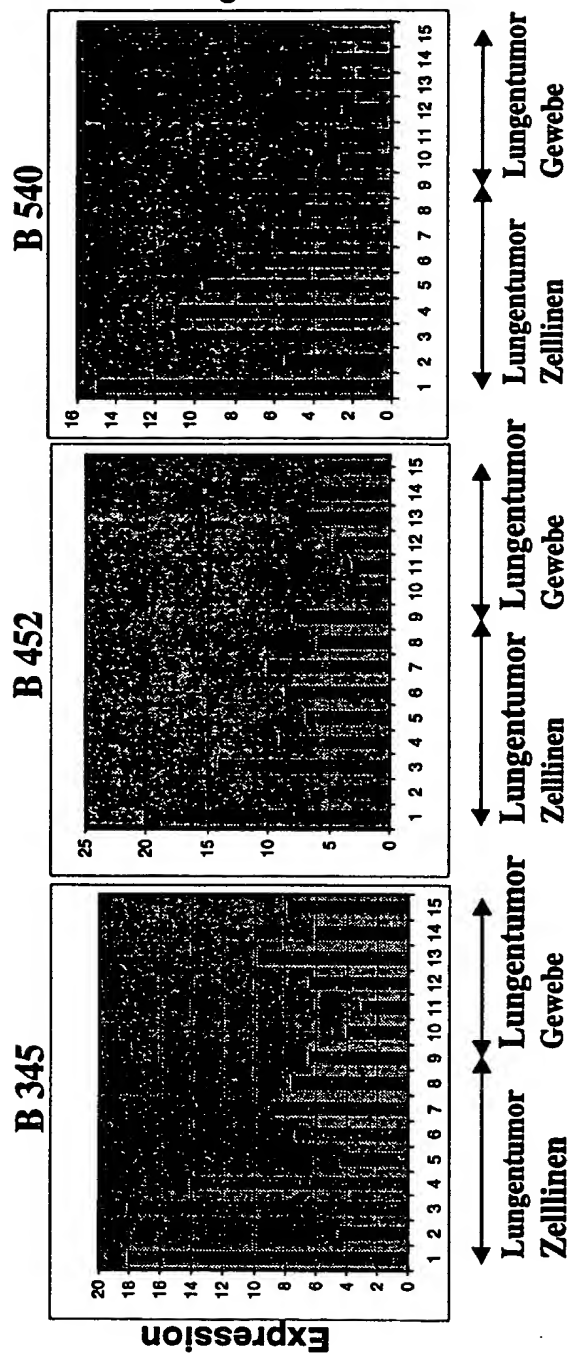


Fig. 1B

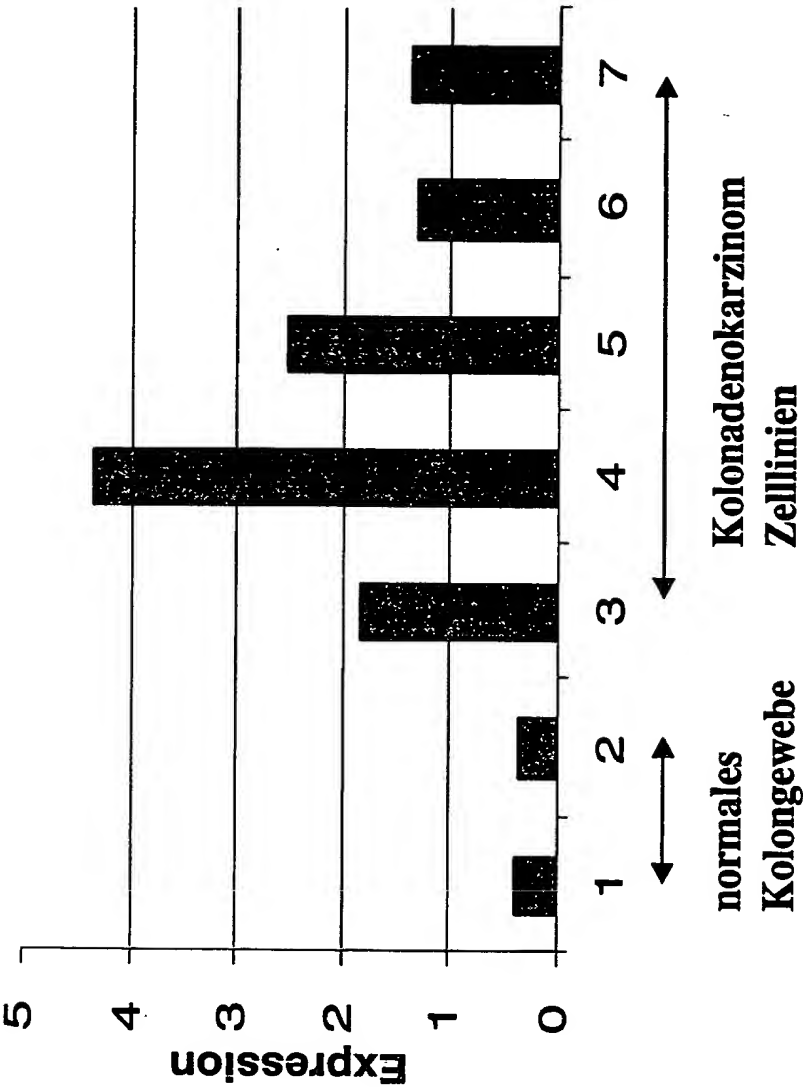


Fig. 1C

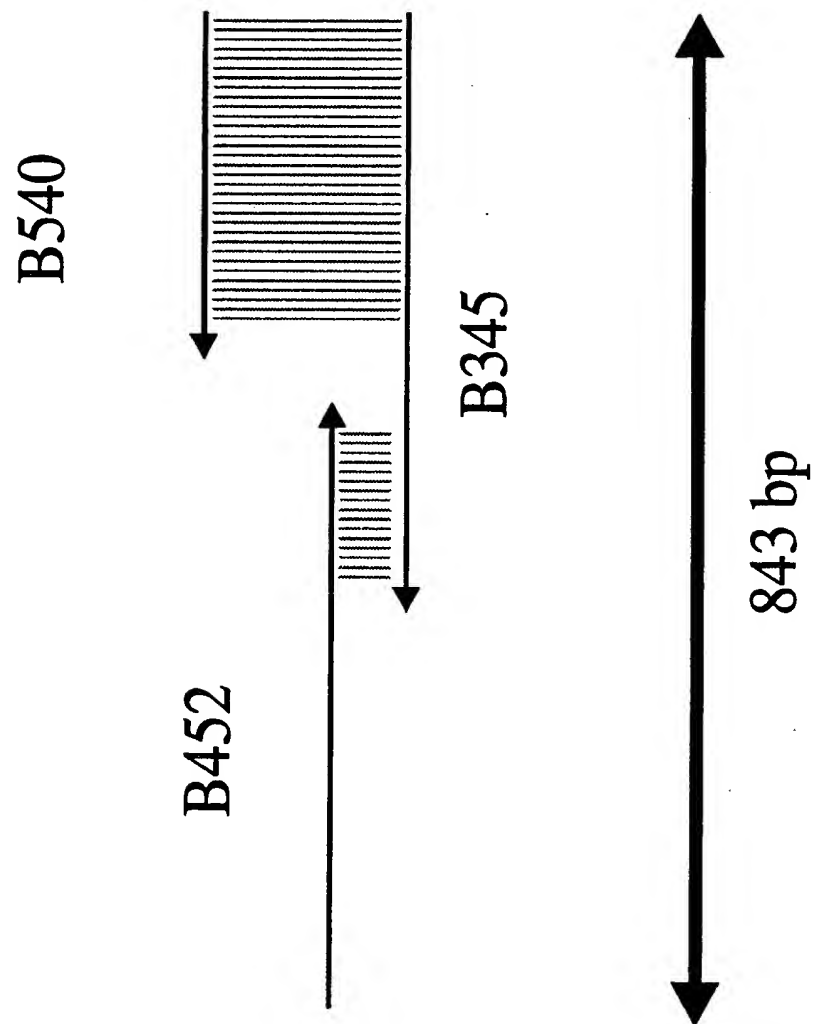


Fig.2A

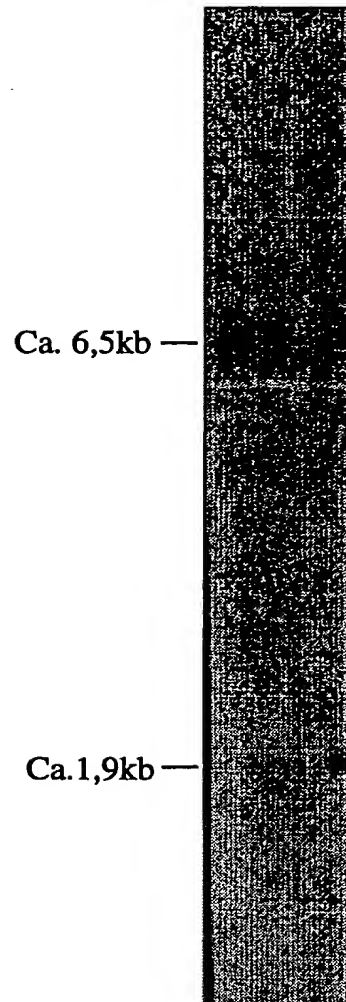


Fig. 2B

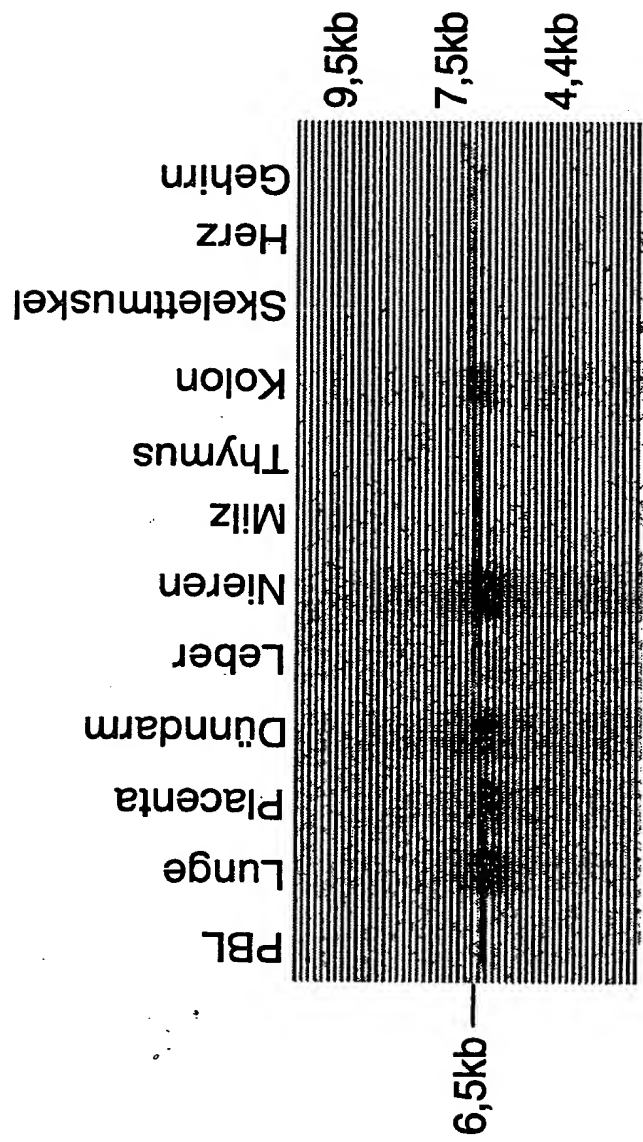


Fig. 2C

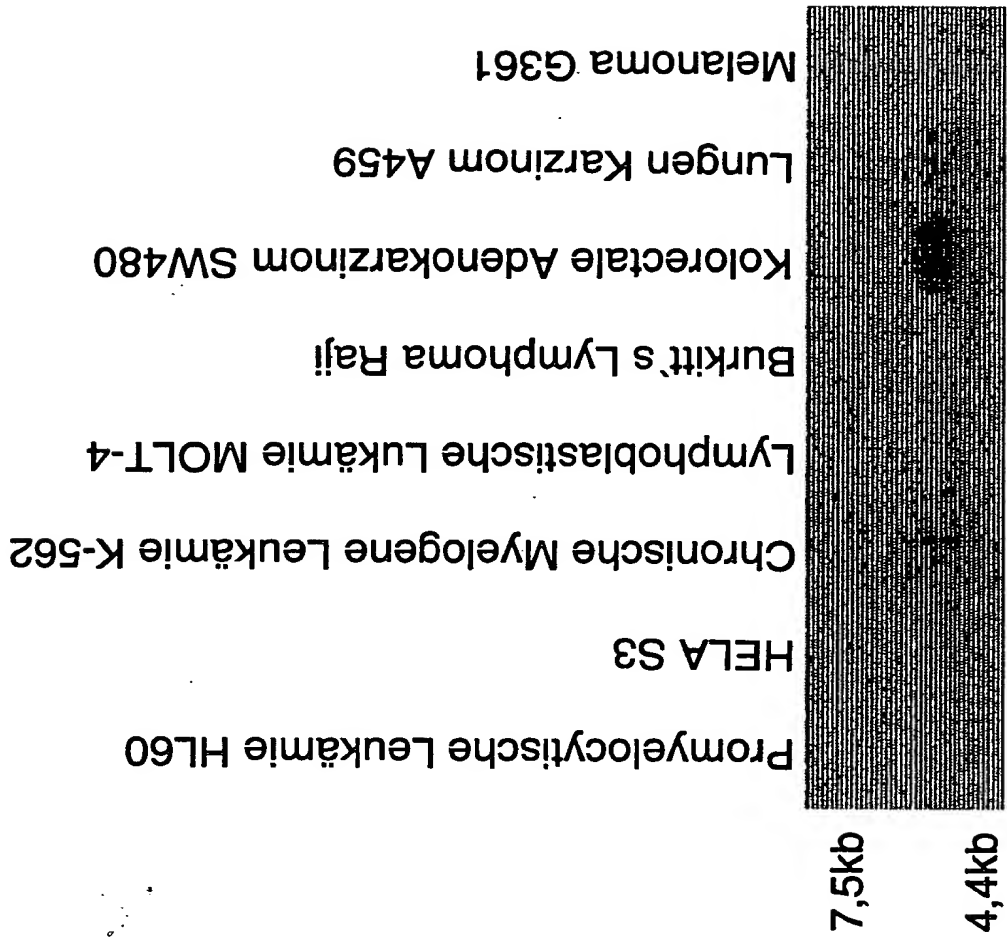


Fig. 3

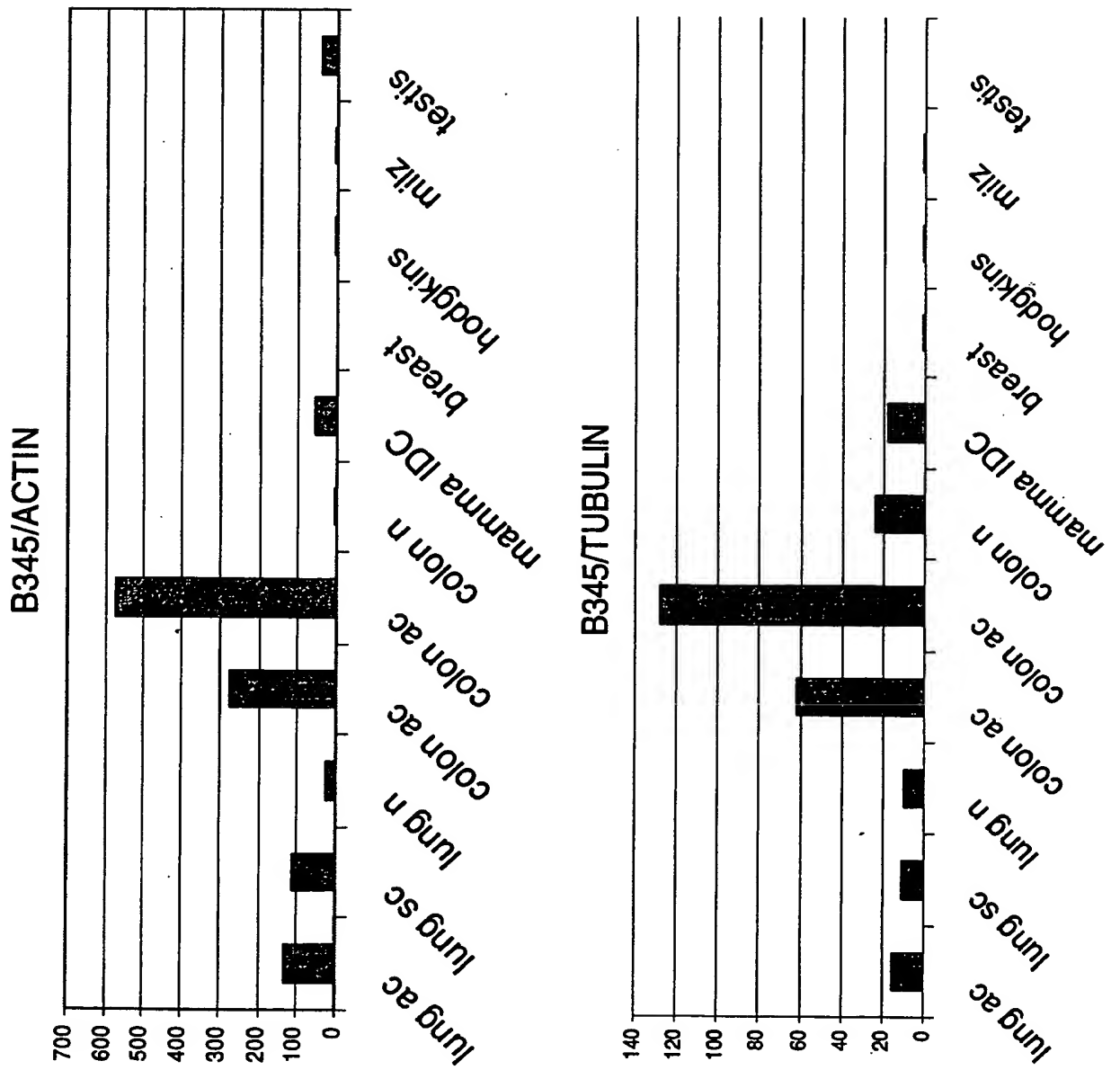


Fig. 4

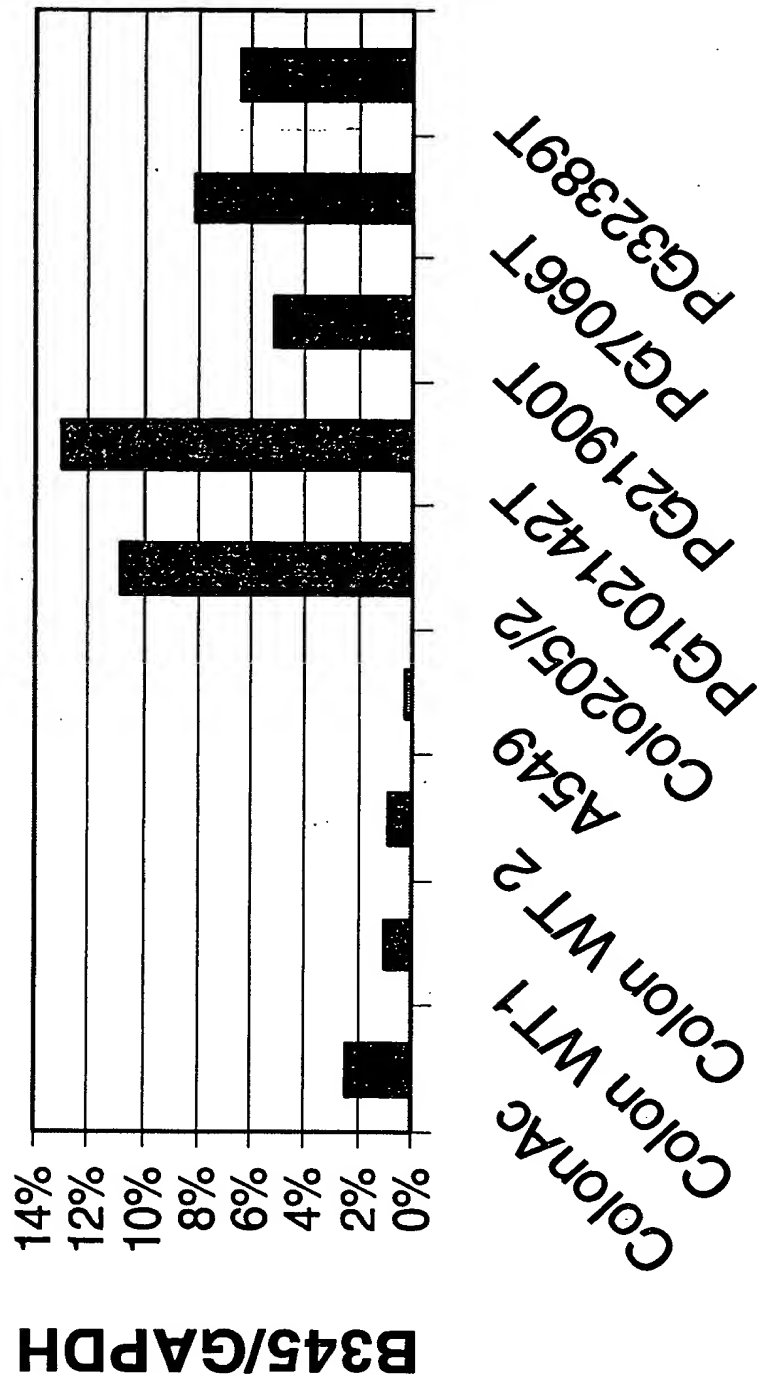
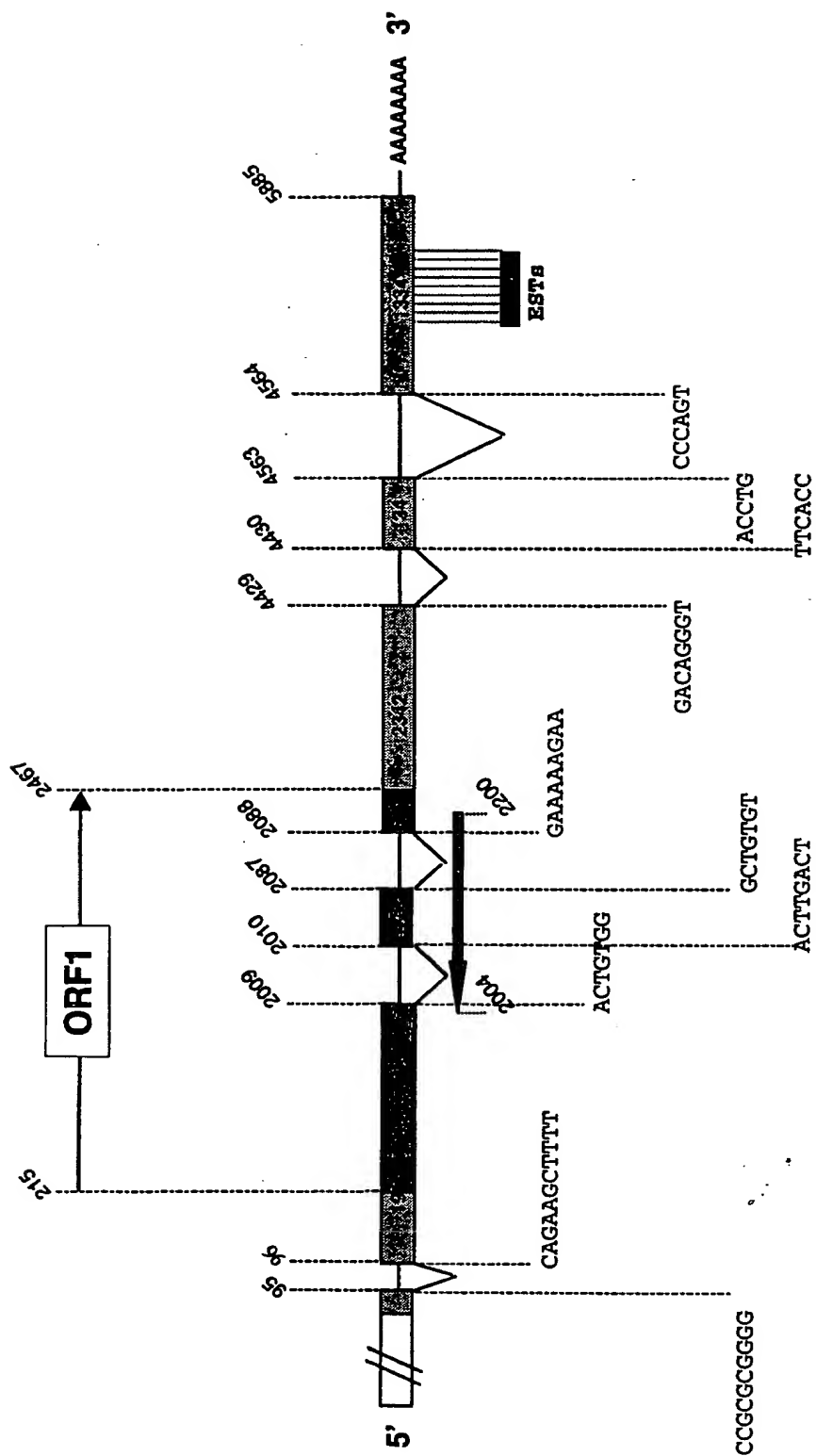


Fig. 5



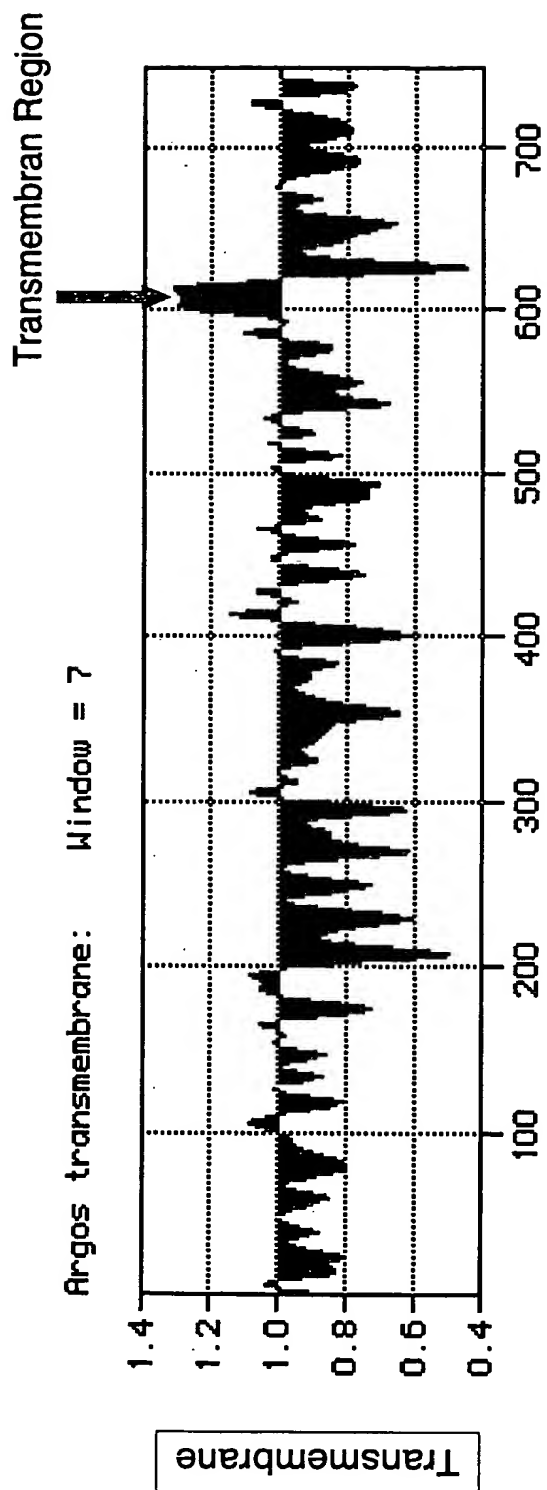


Fig. 6

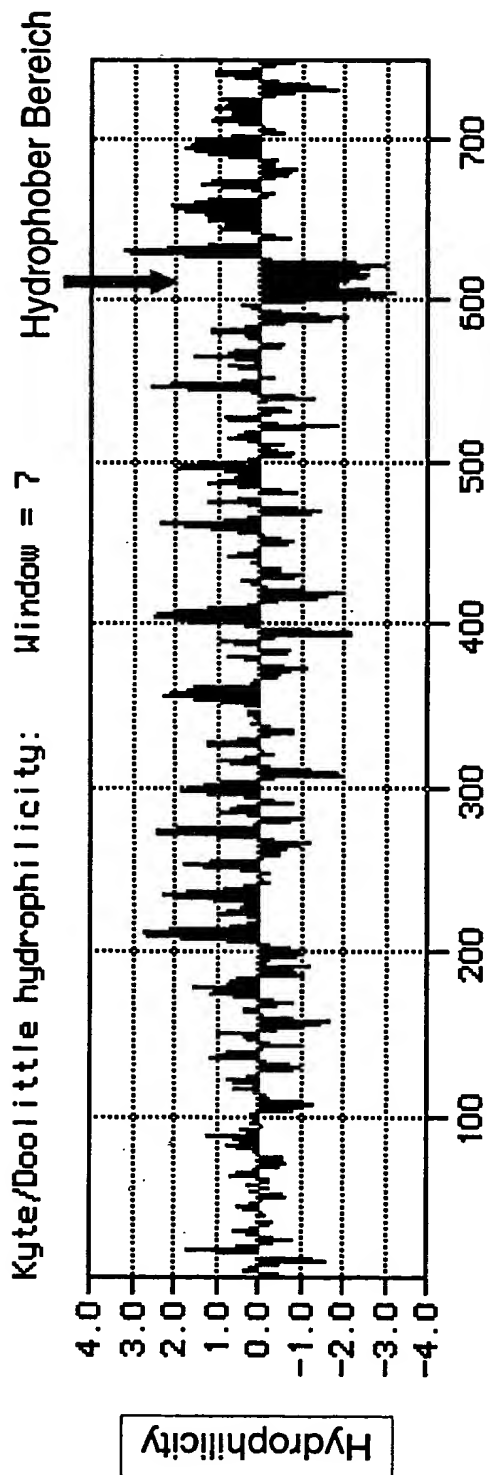
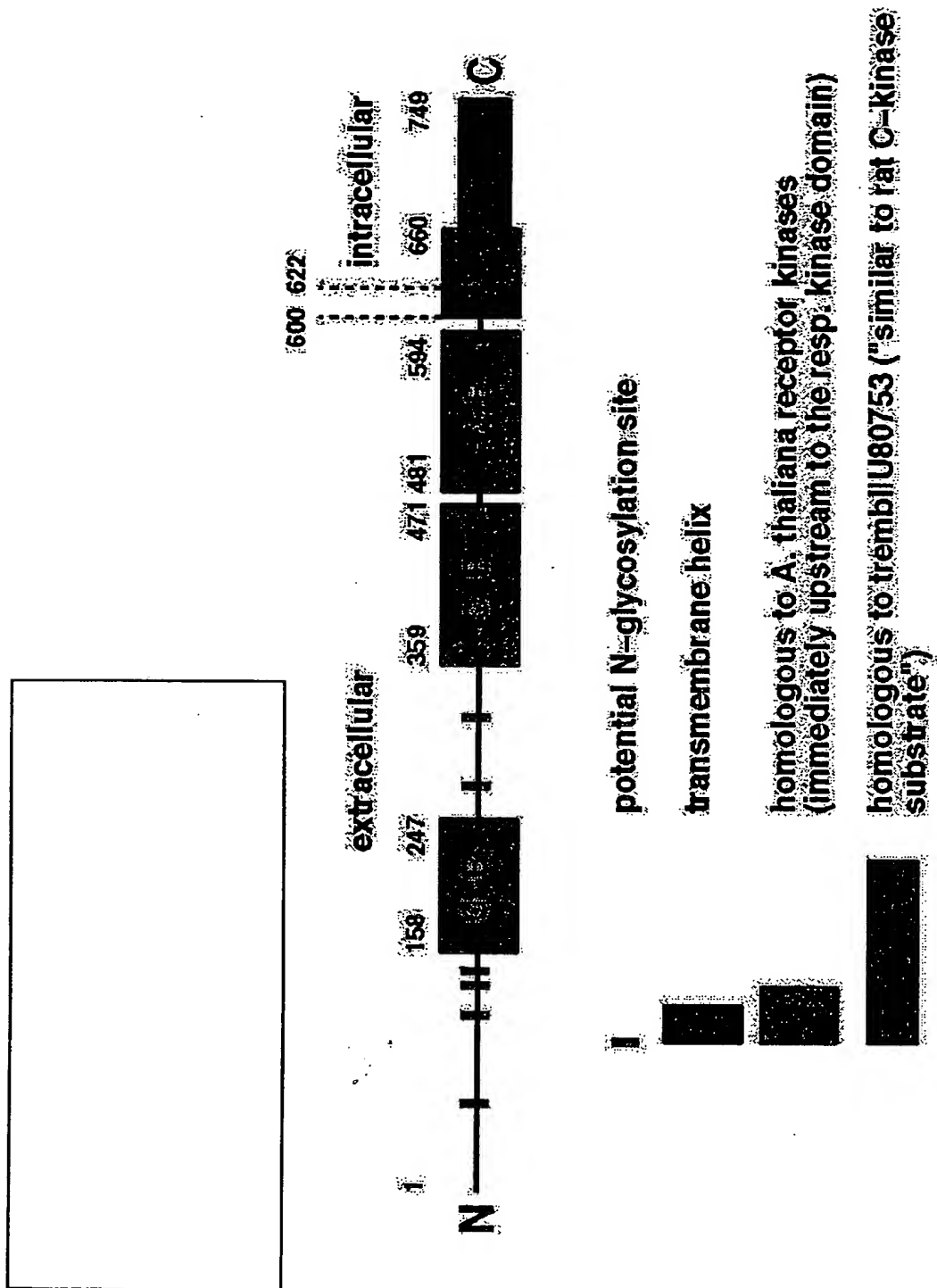


Fig. 7



SEQUENZPROTOKOLL

<110> Boehringer Ingelheim International GmbH

<120> Tumorexprimiertes Polypeptid B345

<130> case12_214

<140>

<141>

<160> 35

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 5896

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> 5'UTR

<222> (1) .. (214)

<220>

<221> CDS

<222> (215) .. (2464)

<220>

<221> 3'UTR

<222> (2465) .. (5896)

<400> 1

cttgagatat tagaattcgc gactcctgaa ctgcgggggc tctatcgac tgctaggggt 60

tctgctgctg ggtgoggcgc gctgcgcgcg oggggcagaa gcttttgaga ttgctctgcc 120

acgagaaagc aacattacag ttctcataaa gctggggacc cgcactctgc tggcaaaacc 180

ctgttacatc gtcatttcta aaagacatat aacc atg ttg tcc atc aag tct gga 235

Met Leu Ser Ile Lys Ser Gly

1

5

gaa aga ata gtc ttt acc ttt agc tgc cag agt cct gag aat cac ttt 283

Glu Arg Ile Val Phe Thr Phe Ser Cys Gln Ser Pro Glu Asn His Phe

10

15

20

gtc ata gag atc cag aaa aat att gac tgt atg tca ggc cca tgt cct 331

Val Ile Glu Ile Gln Lys Asn Ile Asp Cys Met Ser Gly Pro Cys Pro

25

30

35

ttt ggg gag gtt cag ctt cag ccc tog aca tog ttg ttg cct acc ctc 379

Phe Gly Glu Val Gln Leu Gln Pro Ser Thr Ser Leu Leu Pro Thr Leu

40

45

50

55

aac aga act ttc atc tgg gat gtc aaa gct cat aag agc atc ggt tta	427
Asn Arg Thr Phe Ile Trp Asp Val Lys Ala His Lys Ser Ile Gly Leu	
60 65 70	
gag ctg cag ttt tcc atc oct ogc ctg agg cag atc ggt cog ggt gag	475
Glu Leu Gln Phe Ser Ile Pro Arg Leu Arg Gln Ile Gly Pro Gly Glu	
75 80 85	
agc tgc cca gac gga gtc act cac tcc atc agc ggc cga atc gat gcc	523
Ser Cys Pro Asp Gly Val Thr His Ser Ile Ser Gly Arg Ile Asp Ala	
90 95 100	
acc gtg gtc agg atc gga acc ttc tgc agc aat ggc act gtg tcc cgg	571
Thr Val Val Arg Ile Gly Thr Phe Cys Ser Asn Gly Thr Val Ser Arg	
105 110 115	
atc aag atg caa gaa gga gtg aaa atg gcc tta cac ctc cca tgg ttc	619
Ile Lys Met Gln Glu Gly Val Lys Met Ala Leu His Leu Pro Trp Phe	
120 125 130 135	
cac ccc aga aat gtc tcc ggc ttc agc att gca aac ogc tca tct ata	667
His Pro Arg Asn Val Ser Gly Phe Ser Ile Ala Asn Arg Ser Ser Ile	
140 145 150	
aaa cgt ctg tgc atc atc gag tct gtg ttt gag ggt gaa ggc tca gca	715
Lys Arg Leu Cys Ile Ile Glu Ser Val Phe Glu Gly Glu Gly Ser Ala	
155 160 165	
acc ctg atg tct gcc aac tac cca gaa ggc ttc oct gag gat gag ctc	763
Thr Leu Met Ser Ala Asn Tyr Pro Glu Gly Phe Pro Glu Asp Glu Leu	
170 175 180	
atg acg tgg cag ttt gtc gtt oct gca cac ctg ogg gcc agc gtc tcc	811
Met Thr Trp Gln Phe Val Val Pro Ala His Leu Arg Ala Ser Val Ser	
185 190 195	
ttc ctc aac ttc aac ctc tcc aac tgt gag agg aag gag gag cgg gtt	859
Phe Leu Asn Phe Asn Leu Ser Asn Cys Glu Arg Lys Glu Glu Arg Val	
200 205 210 215	
gaa tac tac atc cgg ggc tcc acc acc aac ccc gag gtg ttc aag ctg	907
Glu Tyr Tyr Ile Pro Gly Ser Thr Thr Asn Pro Glu Val Phe Lys Leu	
220 225 230	
gag gac aag cag oct ggg aac atg gcg ggg aac ttc aac ctc tct ctg	955
Glu Asp Lys Gln Pro Gly Asn Met Ala Gly Asn Phe Asn Leu Ser Leu	
235 240 245	
caa ggc tgt gac caa gat gcc caa agt cca ggg atc ctc cgg ctg cag	1003
Gln Gly Cys Asp Gln Asp Ala Gln Ser Pro Gly Ile Leu Arg Leu Gln	
250 255 260	
ttc caa gtt ttg gtc caa cat cca caa aat gaa agc aat aaa atc tac	1051
Phe Gln Val Leu Val Gln His Pro Gln Asn Glu Ser Asn Lys Ile Tyr	
265 270 275	

gtg gtt gac ttg agt aat gag oga gcc atg tca ctc acc atc gag cca	1099
Val Val Asp Leu Ser Asn Glu Arg Ala Met Ser Leu Thr Ile Glu Pro	
280 285 290 295	
ogg ccc gtc aaa cag agc cgc aag ttt gtc cct ggc tgt ttc gtg tgt	1147
Arg Pro Val Lys Gln Ser Arg Lys Phe Val Pro Gly Cys Phe Val Cys	
300 305 310	
cta gaa tct ogg acc tgc agt agc aac ctc acc ctg aca tct ggc tcc	1195
Leu Glu Ser Arg Thr Cys Ser Ser Asn Leu Thr Leu Thr Ser Gly Ser	
315 320 325	
aaa cac aaa atc tcc ttc ctt tgt gat gat ctg aca cgt ctg tgg atg	1243
Lys His Lys Ile Ser Phe Leu Cys Asp Asp Leu Thr Arg Leu Trp Met	
330 335 340	
aat gtg gaa aaa acc ata agc tgc aca gac cac ogg tac tgc caa agg	1291
Asn Val Glu Lys Thr Ile Ser Cys Thr Asp His Arg Tyr Cys Gln Arg	
345 350 355	
aaa tcc tac tca ctc cag gtg ccc agt gac atc ctc cac ctg cct gtg	1339
Lys Ser Tyr Ser Leu Gln Val Pro Ser Asp Ile Leu His Leu Pro Val	
360 365 370 375	
gag ctg cat gac ttc tcc tgg aag ctg ctg gtg ccc aag gac agg ctc	1387
Glu Leu His Asp Phe Ser Trp Lys Leu Leu Val Pro Lys Asp Arg Leu	
380 385 390	
agc ctg gtg ctg gtg cca gcc cag aag ctg cag cag cat aca cac gag	1435
Ser Leu Val Leu Val Pro Ala Gln Lys Leu Gln Gln His Thr His Glu	
395 400 405	
aag ccc tgc aac acc agc ttc agc tac ctc gtg gcc agt gcc ata ccc	1483
Lys Pro Cys Asn Thr Ser Phe Ser Tyr Leu Val Ala Ser Ala Ile Pro	
410 415 420	
agc cag gac ctg tac ttc ggc tcc ttc tgc ccg gga ggc tct atc aag	1531
Ser Gln Asp Leu Tyr Phe Gly Ser Phe Cys Pro Gly Gly Ser Ile Lys	
425 430 435	
cag atc cag gtg aag cag aac atc tog gtg acc ctt cgc acc ttt gcc	1579
Gln Ile Gln Val Lys Gln Asn Ile Ser Val Thr Leu Arg Thr Phe Ala	
440 445 450 455	
ccc agc ttc caa caa gag gcc tcc agg cag ggt ctg acg gtg tcc ttt	1627
Pro Ser Phe Gln Gln Glu Ala Ser Arg Gln Gly Leu Thr Val Ser Phe	
460 465 470	
ata cct tat ttc aaa gag gaa ggc gtt ttc acg gtg acc cct gac aca	1675
Ile Pro Tyr Phe Lys Glu Glu Gly Val Phe Thr Val Thr Pro Asp Thr	
475 480 485	
aaa agc aag gtc tac ctg agg acc ccc aac tgg gac cgg ggc ctg cca	1723
Lys Ser Lys Val Tyr Leu Arg Thr Pro Asn Trp Asp Arg Gly Leu Pro	
490 495 500	

toc ctc acc tct gtg tcc tgg aac atc agc gtg ccc aga gac cag gtg	1771
Ser Leu Thr Ser Val Ser Trp Asn Ile Ser Val Pro Arg Asp Gln Val	
505 510 515	
gcc tgc ctg act ttc ttt aag gag ogg agc ggc gtg gtc tgc cag aca	1819
Ala Cys Leu Thr Phe Phe Lys Glu Arg Ser Gly Val Val Cys Gln Thr	
520 525 530 535	
ggg ogc gca ttc atg atc atc cag gag cag ogg acc ogg gct gag gag	1867
Gly Arg Ala Phe Met Ile Ile Gln Glu Gln Arg Thr Arg Ala Glu Glu	
540 545 550	
atc ttc agc ctg gac gag gat gtg ctc ccc aag cca agc ttc cac cat	1915
Ile Phe Ser Leu Asp Glu Asp Val Leu Pro Lys Pro Ser Phe His His	
555 560 565	
cac agc ttc tgg gtc aac atc tct aac tgc agc ccc acg agc ggc aag	1963
His Ser Phe Trp Val Asn Ile Ser Asn Cys Ser Pro Thr Ser Gly Lys	
570 575 580	
cag cta gac ctg ctc ttc tog gtg aca ctt acc cca agg act gtg gac	2011
Gln Leu Asp Leu Leu Phe Ser Val Thr Leu Thr Pro Arg Thr Val Asp	
585 590 595	
ttg act gtc atc ctc atc gca gog gtg gga ggt gga gtc tta ctg ctg	2059
Leu Thr Val Ile Leu Ile Ala Ala Val Gly Gly Gly Val Leu Leu Leu	
600 605 610 615	
tct gcc ctc ggg ctc atc att tgc tgt gtg aaa aag aag aaa aag aag	2107
Ser Ala Leu Gly Leu Ile Ile Cys Cys Val Lys Lys Lys Lys Lys Lys	
620 625 630	
aca aac aag ggc ccc gct gtg ggt atc tac aat ggc aac atc aat act	2155
Thr Asn Lys Gly Pro Ala Val Gly Ile Tyr Asn Gly Asn Ile Asn Thr	
635 640 645	
gag atg cca ggc agc caa aaa agt ttc aga aag ggc gaa agg aca atg	2203
Glu Met Pro Gly Ser Gln Lys Ser Phe Arg Lys Gly Glu Arg Thr Met	
650 655 660	
act ccc atg tgt atg cag tca tog agg aca cca tgg tat atg ggc atc	2251
Thr Pro Met Cys Met Gln Ser Ser Arg Thr Pro Trp Tyr Met Gly Ile	
665 670 675	
tgc tac agg att cca gog gct cct tcc tgc agc cag agg tgg aca cct	2299
Cys Tyr Arg Ile Pro Ala Ala Pro Ser Cys Ser Gln Arg Trp Thr Pro	
680 685 690 695	
acc ggc ogt tcc agg gca cca tgg ggg tct gtc ctc cct ccc cac cca	2347
Thr Gly Arg Ser Arg Ala Pro Trp Gly Ser Val Leu Pro Pro His Pro	
700 705 710	
cca tat gct cca ggg ccc caa ctg caa agt tgg cca ctg agg agc cac	2395
Pro Tyr Ala Pro Gly Pro Gln Leu Gln Ser Trp Pro Leu Arg Ser His	
715 720 725	

ctc ctc gct ccc ctc ctg agt ctg aga gtg aac ogt aca cct tct ccc 2443
 Leu Leu Ala Pro Leu Leu Ser Leu Arg Val Asn Arg Thr Pro Ser Pro
 730 735 740

atc oca aca atg ggg atg taa gcagcaagga cacagacatt cocttactga 2494
 Ile Pro Thr Met Gly Met
 745 750

acactcagga gccatggag ccagcagaat aacttgatcc attccagaag ctttgctgag 2554
 ttccataaag cagggcactg agacaccogt cagtgttcc aaccagaaat cctaaagaag 2614
 aggaattata cagaaggaac agcaggaggt tttcctggac accgccaaact tcacattgct 2674
 cagtggactc attctaaggg caagacattg aaaatgatga attccaatct ggatacagtc 2734
 atgacagctc atgtgctcct caacttaggc tgtgcgggta gccagcctgt aatgagagga 2794
 gagaggcctg agtcacctag cataggggtg cagcaagccc tggattcaga gtgttaaaca 2854
 gaggcttgcc ctcttcagga caacagttcc aattccaagg agcctacctg aggtccctac 2914
 tctcactggg gtccccagga tgaaaacgac aatgtgcctt tttattatta tttatttggg 2974
 ggtcctgtgt tatttaagag atcaaagtga taaccaccta gctcttttca cctgacttag 3034
 taataactca tactaactgg tttggatgcc tgggttgtga cttctactga cagctagata 3094
 aacgtgtgcc tgtccccag gtggtgggaa taatttaca tctgtccaac cagaaaagaa 3154
 tgtgtgtgtt tgagcagcat tgacacatat ctgctttgat aagagacttc ctgattctct 3214
 aggtcgggtc gtggttatcc cattgtggaa attcatcttg aatccattg tctatagtc 3274
 ctagcaataa gagaaatttc ctcaagtttc catgtgcggg tctcctagct gcagcaatac 3334
 tttgacattt aaagagaaat tttagagaata ttctcatcct ctaaaaatgt ttaaataat 3394
 accaaacagt ggccccctgc attagttttc tgttgccact gcaaccatt acttggtagc 3454
 ttaaaaacaa cacattagct tatagtctg gggatcagaa ttccaaaatg gatgtccctg 3514
 aatgaaaatc aaggtgtcag cagagctgtg ctcttctga aggtcttagg gagaagcggg 3574
 ttctttgcca tttcaagctt ctagaggtg gctgcattcc caggctccag tggctggtca 3634
 agcttttctc acatggcatc actgtgacac tggccctccc acttccctct ttgacttaca 3694
 aagcccacca ggaagatcca ggataatctc tccatctaaa gatccttcat catcctggaa 3754
 gagccttttg ccatgcaaga caacatagcc acaggtgggg attaggacca ggacatcttt 3814
 ggggtgctgt tattctgcct accacacctt cctgccachg actccacag gagaggttac 3874
 aaaatgatct gggcacagg gatgttttgg ttagcttgog gactctaaca cttaaaaaaa 3934
 ccccatatca gaagatctgg ccatgctggg gctcacattc tcacctagca acaactggct 3994

ggagctgggc accagctctg octttagaag ggggtgtccac ttcaccaggt caccacagcc 4054
 cacactaogc octatcactt occacaatga ggctaagtgt ttgtttctac tgatcaatgc 4114
 coctgcaggt tgcatttatt gtaatgaaaa agaaagactg ggattaatct ctaatcaggt 4174
 gagtagacca tgagaccaat gtgtgtccac attacocctt ttcttttttt tctttttctt 4234
 tttctttttt tttttaatgt gagacaggat ctcatctgtt tgcctaggct ggagtgcagt 4294
 ggogcaatct oggctcactg caacctctgc ctctgggct caagcaattc tcccacctca 4354
 gctccocaaa tagctgggat cactggcaca aaccaccatg occagctaatt tttgtatttt 4414
 ttgtagagac agggtttcac catgttgccc aggtgggtct caacctcctg ggctcaagca 4474
 atcctcctgc ctgggctcc caaagtgtg ggattacaga tgtgagccac cgcattccagc 4534
 occacacct catttatacc aattacctgc ccagtaactg tggacttttg ctctctcacc 4594
 cctgctctga tctggaagga gagggattat gttatagctt gtcagcacag tccaagtgc 4654
 aatatttctg cggcaaaaac ttcttcaaaa aaataaatgt acttcattgt attcaatgaa 4714
 ttcaocttgg aaatgcacog cctcaacttg ttcacatggc ataaatgaaa ggaattttat 4774
 agtctcctaa atggogtga ctgcaagacc tctgaacac ttccagagg ataggatatt 4834
 taagtcatgc ccttggogtt gctatggca ccttccctt ctgaaagtct ggttctgcc 4894
 cagtgacct tggccttgtg agcogagatg ctgacctgc ataaagggcc aaaggagggc 4954
 tgggcttcc ttccctcact gaagagcct tatttgaatt cactgtgtgg agccctagcc 5014
 ctccattctc gacattcccc aacctccag ccccttccaa gcaggactag gtgcctgca 5074
 ttccacccaa ggtgggattg gcttctctta ggctggctac ttgtcaccat caccgacatc 5134
 actgttgct gcaaggacac cactggcca ttttcttca actgagggct caaaactcct 5194
 ggacaagttg ctggctcctg agaccagtat ttctggagm tgtgcctcag tgaaggggcc 5254
 cagcctgagg aacctgggt cttttcttta aagcccaggc ccacttaca taaaacattt 5314
 cagggctact ggaaacagtg aagtgcatt tgtngaagcc tactgnatgc cagccactg 5374
 ctcatccaog tggatgcca tgctacagag gaagggcagc gcatgcagga ntggctctca 5434
 atgntgtggt cattgcacag aagggaaagg tctcaaggaa gactcaactg ggacaagcac 5494
 aagcccaccg gacatggcct tggtaaagg tagcagactg gtgtgtgtgg atctgcagtg 5554
 ctctactgga aataatttat tcattgcaga tacttttttag gtggcatttt attcatttcc 5614
 tgtgctttaa ataaacaaat gtacaaaaa acaagtatca agctgtttaa gtgcttggc 5674
 tacttgccc ctggttcagt agaggcccg gttcccagt tgttgactgt gacaggctca 5734

gcattgggctc agcagatgct gtcttaattt gtggatgata cagaaagcca ggctttggga 5794
 tacaagttct ttctcttcca ttgatgcog tgcactgtgt gaagcagatg tttttgtcog 5854
 gaaataaaaa taatagtctt ggagtctogc caaaaaaaaa aa 5896

<210> 2
 <211> 749
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Met Leu Ser Ile Lys Ser Gly Glu Arg Ile Val Phe Thr Phe Ser Cys
 1 5 10 15
 Gln Ser Pro Glu Asn His Phe Val Ile Glu Ile Gln Lys Asn Ile Asp
 20 25 30
 Cys Met Ser Gly Pro Cys Pro Phe Gly Glu Val Gln Leu Gln Pro Ser
 35 40 45
 Thr Ser Leu Leu Pro Thr Leu Asn Arg Thr Phe Ile Trp Asp Val Lys
 50 55 60
 Ala His Lys Ser Ile Gly Leu Glu Leu Gln Phe Ser Ile Pro Arg Leu
 65 70 75 80
 Arg Gln Ile Gly Pro Gly Glu Ser Cys Pro Asp Gly Val Thr His Ser
 85 90 95
 Ile Ser Gly Arg Ile Asp Ala Thr Val Val Arg Ile Gly Thr Phe Cys
 100 105 110
 Ser Asn Gly Thr Val Ser Arg Ile Lys Met Gln Glu Gly Val Lys Met
 115 120 125
 Ala Leu His Leu Pro Trp Phe His Pro Arg Asn Val Ser Gly Phe Ser
 130 135 140
 Ile Ala Asn Arg Ser Ser Ile Lys Arg Leu Cys Ile Ile Glu Ser Val
 145 150 155 160
 Phe Glu Gly Glu Gly Ser Ala Thr Leu Met Ser Ala Asn Tyr Pro Glu
 165 170 175
 Gly Phe Pro Glu Asp Glu Leu Met Thr Trp Gln Phe Val Val Pro Ala
 180 185 190
 His Leu Arg Ala Ser Val Ser Phe Leu Asn Phe Asn Leu Ser Asn Cys
 195 200 205
 Glu Arg Lys Glu Glu Arg Val Glu Tyr Tyr Ile Pro Gly Ser Thr Thr
 210 215 220
 Asn Pro Glu Val Phe Lys Leu Glu Asp Lys Gln Pro Gly Asn Met Ala
 225 230 235 240

Gly Asn Phe Asn Leu Ser Leu Gln Gly Cys Asp Gln Asp Ala Gln Ser
 245 250 255
 Pro Gly Ile Leu Arg Leu Gln Phe Gln Val Leu Val Gln His Pro Gln
 260 265 270
 Asn Glu Ser Asn Lys Ile Tyr Val Val Asp Leu Ser Asn Glu Arg Ala
 275 280 285
 Met Ser Leu Thr Ile Glu Pro Arg Pro Val Lys Gln Ser Arg Lys Phe
 290 295 300
 Val Pro Gly Cys Phe Val Cys Leu Glu Ser Arg Thr Cys Ser Ser Asn
 305 310 315 320
 Leu Thr Leu Thr Ser Gly Ser Lys His Lys Ile Ser Phe Leu Cys Asp
 325 330 335
 Asp Leu Thr Arg Leu Trp Met Asn Val Glu Lys Thr Ile Ser Cys Thr
 340 345 350
 Asp His Arg Tyr Cys Gln Arg Lys Ser Tyr Ser Leu Gln Val Pro Ser
 355 360 365
 Asp Ile Leu His Leu Pro Val Glu Leu His Asp Phe Ser Trp Lys Leu
 370 375 380
 Leu Val Pro Lys Asp Arg Leu Ser Leu Val Leu Val Pro Ala Gln Lys
 385 390 395 400
 Leu Gln Gln His Thr His Glu Lys Pro Cys Asn Thr Ser Phe Ser Tyr
 405 410 415
 Leu Val Ala Ser Ala Ile Pro Ser Gln Asp Leu Tyr Phe Gly Ser Phe
 420 425 430
 Cys Pro Gly Gly Ser Ile Lys Gln Ile Gln Val Lys Gln Asn Ile Ser
 435 440 445
 Val Thr Leu Arg Thr Phe Ala Pro Ser Phe Gln Gln Glu Ala Ser Arg
 450 455 460
 Gln Gly Leu Thr Val Ser Phe Ile Pro Tyr Phe Lys Glu Glu Gly Val
 465 470 475 480
 Phe Thr Val Thr Pro Asp Thr Lys Ser Lys Val Tyr Leu Arg Thr Pro
 485 490 495
 Asn Trp Asp Arg Gly Leu Pro Ser Leu Thr Ser Val Ser Trp Asn Ile
 500 505 510
 Ser Val Pro Arg Asp Gln Val Ala Cys Leu Thr Phe Phe Lys Glu Arg
 515 520 525
 Ser Gly Val Val Cys Gln Thr Gly Arg Ala Phe Met Ile Ile Gln Glu
 530 535 540

Gln Arg Thr Arg Ala Glu Glu Ile Phe Ser Leu Asp Glu Asp Val Leu
 545 550 555 560
 Pro Lys Pro Ser Phe His His His Ser Phe Trp Val Asn Ile Ser Asn
 565 570 575
 Cys Ser Pro Thr Ser Gly Lys Gln Leu Asp Leu Leu Phe Ser Val Thr
 580 585 590
 Leu Thr Pro Arg Thr Val Asp Leu Thr Val Ile Leu Ile Ala Ala Val
 595 600 605
 Gly Gly Gly Val Leu Leu Leu Ser Ala Leu Gly Leu Ile Ile Cys Cys
 610 615 620
 Val Lys Lys Lys Lys Lys Lys Thr Asn Lys Gly Pro Ala Val Gly Ile
 625 630 635 640
 Tyr Asn Gly Asn Ile Asn Thr Glu Met Pro Gly Ser Gln Lys Ser Phe
 645 650 655
 Arg Lys Gly Glu Arg Thr Met Thr Pro Met Cys Met Gln Ser Ser Arg
 660 665 670
 Thr Pro Trp Tyr Met Gly Ile Cys Tyr Arg Ile Pro Ala Ala Pro Ser
 675 680 685
 Cys Ser Gln Arg Trp Thr Pro Thr Gly Arg Ser Arg Ala Pro Trp Gly
 690 695 700
 Ser Val Leu Pro Pro His Pro Pro Tyr Ala Pro Gly Pro Gln Leu Gln
 705 710 715 720
 Ser Trp Pro Leu Arg Ser His Leu Leu Ala Pro Leu Leu Ser Leu Arg
 725 730 735
 Val Asn Arg Thr Pro Ser Pro Ile Pro Thr Met Gly Met
 740 745

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 3

accgcctcaa cttgttcaca tgg

23

<210> 4

<211> 26

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 4

ctggtctcag gagccagcaa ctgtgc

26

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 5

ctcatgacgt ggcagtttgc cggtc

25

<210> 6

<211> 26

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 6

ggctcgtca ttactcaagt caacca

26

<210> 7

<211> 36

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 7

attcgcgact gatgatgat tttttttttt tttttt

36

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 8

attcgcgact gatgatgat

20

<210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 9

gagatattag aattctactc

20

<210> 10
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 10

gagtagaatt ctaatat

17

<210> 11
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 11

agtccatgtg aacaagttga gg

22

<210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 12

aattctccca cctcagcctc

20

<210> 13
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 13

aggatgaaaa ogacaatgtg cc

22

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 14

agaattgctt gagccagga g

21

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 15

caacttcaca ttgtcagtg g

21

<210> 16

<211> 25

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 16

tgagcaagtt cagcctgggtt aagtc

25

<210> 17

<211> 26

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 17

caccgaatac tcataaagaa ggtccc

26

<210> 18
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 18
 tagacttoga gcaggagatg gccact

26

<210> 19
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 19
 ccagccatgt acgtagccat

20

<210> 20
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 20
 ccaagaagga aggctggaa

19

<210> 21
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 21
 ccatcaccat cttccaggag cgaga

25

<210> 22
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 22

ccaagaagga aggctggaa

19

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 23

tgcaggaggc attgctgatg

20

<210> 24

<211> 19

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 24

aaatogtgca cttgcaggc

19

<210> 25

<211> 18

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 25

ttgatgcgtt ccagctga

18

<210> 26

<211> 21

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 26

ttgaattcac tgtgtggagc c

21

<210> 27
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 27

tgcaggcaac agtgatgtc

19

<210> 28
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 28

attggccttc cttaggctgg ctac

24

<210> 29
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 29

tgtagcgtga agacgacaga aagggcgtgg tacogagctc gag

43

<210> 30
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 30

agggcgtggt acogagctog ag

22

<210> 31
 <211> 11
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 31

ggctogagct c

11

<210> 32

<211> 22

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 32

ggccatgtcc ggtgggcttg tg

22

<210> 33

<211> 26

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 33

ctcaaaactc ctggacaagt tgctgg

26

<210> 34

<211> 22

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 34

aaggtgaagg toggagtcaa cg

22

<210> 35

<211> 24

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 35

ggcagagatg atgacctttt tggc

24